

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**



**FACULTAD DE MEDICINA**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DEL EFECTO SOBRE LA HEMOSTASIA DE LOS  
DISTINTOS AGENTES TERAPÉUTICOS UTILIZADOS EN EL  
TRATAMIENTO DE LA TROMBOCITOPENIA INMUNE**

**M<sup>a</sup> ISABEL RIVAS POLLMAR**

**2017**

# **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

## **FACULTAD DE MEDICINA**

### **ESTUDIO DEL EFECTO SOBRE LA HEMOSTASIA DE LOS DISTINTOS AGENTES TERAPÉUTICOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE LA TROMBOCITOPENIA INMUNE**

Tesis presentada por **M<sup>a</sup> ISABEL RIVAS POLLMAR** para optar al grado de Doctor por la

Universidad Autónoma de Madrid

#### **Directores:**

**Dra. Nora Butta Coll**

Instituto para la Investigación Biomédica  
del H. U. La Paz (FIBHULP)

Hospital Universitario La Paz- IdiPaz

Madrid

**Dra. M<sup>a</sup> Teresa Álvarez Román**

Servicio de Hematología y Hemoterapia

Hospital Universitario La Paz- IdiPaz

Madrid

**Dr. Víctor Jiménez Yuste**

Servicio de Hematología y Hemoterapia

Hospital Universitario La Paz- IdiPaz

Profesor Asociado de Ciencias de la  
Salud

Departamento de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

**Madrid, 2017**

*A mis padres*

## Agradecimientos

A mis directores de tesis Mayte, Nora y Víctor por su continuo apoyo y ayuda para que este proyecto saliera adelante, por la ilusión que me han transmitido en todo momento y porque sin su orientación y ayuda continuos este trabajo no hubiera sido posible.

A mis padres por animarme desde el principio y haberme transmitido su entusiasmo por la Medicina. Por su apoyo incondicional, porque con su cariño y alegría son para mí un ejemplo a seguir. Ojalá mi padre esté conmigo el día de la lectura.

A mi familia porque han vivido este proyecto como si fuera suyo.

A Alejandro, para que vea que con esfuerzo todo se consigue y que por mucho que se compliquen las cosas no hay que perder la ilusión.

A Mercedes por su paciencia, por su ayuda y soporte nutricional durante este tiempo. A Pilar, Karem y Mónica por su apoyo y ánimos en los días torcidos.

A Sara y Paula por su inestimable ayuda con la tecnología que se me resiste, por haberme ayudado tantas tardes sin desesperarse.

A mis compañeras Mar y M<sup>a</sup> Jesús por apoyarme para que pudiera terminar la tesis.

A Ihosvany, Raúl, Tamara y Elena por su ayuda y compañerismo en el trabajo diario.

A las enfermeras, auxiliares, técnicos de laboratorio y secretarias que me han ayudado con su trabajo y apoyo para acabar este trabajo.

A todos los que de alguna manera han contribuído, me han animado y han estado pendientes de mí todo este tiempo.

Este trabajo pudo realizarse gracias a la financiación FIS-FONDOS FEDER PI 15/01457.

# **ÍNDICE DE MATERIAS**

## Índice de Materias

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>1</b>
<b>Lista de figuras .....</b>	<b>7</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>11</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>15</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>23</b>
1.1. Recuerdo histórico del estudio de las plaquetas .....	25
1.2. Generalidades de las plaquetas .....	26
1.2.1.    Producción de las plaquetas. Megacariopoyesis .....	28
1.2.2.    La trombopoyetina y su receptor .....	34
1.2.3.    Estructura de las plaquetas .....	37
1.2.3.1.    Membrana plaquetaria .....	37
1.2.3.2.    Zona sol-gel .....	39
1.2.3.3.    Sistemas membranosos .....	42
1.2.3.4.    Estructuras inespecíficas.....	43
1.2.4.    Plaquetas: Funciones.....	43
1.2.4.1.    Plaquetas en la hemostasia .....	43
1.2.4.2.    Plaquetas en la inflamación.....	50
1.2.4.3.    Plaquetas en la respuesta antimicrobiana .....	51
1.2.4.4.    Plaquetas en los procesos neoplásicos .....	51
1.2.5.    Apoptosis de las plaquetas .....	52
1.2.6.    Micropartículas.....	55

1.3. Papel de las plaquetas en la hemostasia.....	60
1.4. Trombocitopenia .....	62
1.4.1. Trombocitopenia de origen periférico. Trombocitopenia inmune ...	63
1.4.1.1. Etiopatogenia.....	65
1.4.1.2. Terminología y definiciones.....	72
1.4.1.3. Manifestaciones clínicas.....	74
1.4.1.4. Riesgo trombótico .....	75
1.4.1.5. Diagnóstico .....	75
1.4.1.6. Tratamiento .....	77
1.4.1.6.1. Tratamiento de primera línea .....	77
1.4.1.6.1.1. Corticoides.....	78
1.4.1.6.1.2. Inmunoglobulinas .....	80
1.4.1.6.2. Tratamiento de segunda línea.....	84
1.4.1.6.2.1. Esplenectomía .....	84
1.4.1.6.2.2. Agonistas de la trombopoyetina .....	86
1.4.1.6.2.3. Rituximab.....	97
1.4.1.6.3. Tratamiento de tercera línea.....	99
1.4.1.6.4. Tratamiento en pacientes refractarios.....	100
1.4.1.6.4.1. Oseltamivir.....	100
<b>2. Hipótesis.....</b>	<b>103</b>
<b>3. Objetivo.....</b>	<b>107</b>

<b>4. Materiales y métodos</b>	<b>111</b>
4.1. Descripción de los pacientes incluidos en el estudio	113
4.2. Criterios para la inclusión y exclusión de los pacientes en el estudio	115
4.2.1. Criterios de inclusión	115
4.2.2. Criterios de exclusión comunes a pacientes y controles sanos	115
4.3. Extracción y preparación de las muestras	116
4.4. Análisis de las muestras	117
4.4.1. Recuento de plaquetas	117
4.4.2. Determinación de los niveles de trombopoyetina en plasma	117
4.4.3. Determinación de plaquetas inmaduras o reticuladas	118
4.4.4. Determinación de los niveles plasmáticos de APRIL	118
4.4.5. Estudio de la activación plaquetaria	118
4.4.6. Presencia de signos de apoptosis en las plaquetas	119
4.4.7. Estudio de la actividad procoagulante del plasma	120
4.4.8. Estudio de la actividad procoagulante del plasma asociada a micropartículas	123
4.4.9. Caracterización del origen celular de las micropartículas	124
4.4.10. Análisis estadístico	124
<b>5. Resultados</b>	<b>127</b>
5.1. Estudio transversal de las plaquetas de pacientes sometidos a distintos tratamientos	129
5.1.1. Características de los pacientes	130
5.1.2. Recuento de plaquetas en los distintos grupos	136



5.1.3.	Estudio de los niveles de trombopoyetina en los pacientes sometidos a distintos tratamientos .....	136
5.1.4.	Estudio del número de plaquetas inmaduras en los distintos grupos .. .....	137
5.1.5.	Estudio de los niveles plasmáticos de APRIL .....	138
5.1.6.	Estudio de la funcionalidad plaquetaria .....	138
5.1.7.	Expresión del receptor del fibrinógeno en la superficie de las plaquetas.....	140
5.1.8.	Apoptosis de las plaquetas de los pacientes con PTI sometidos a distintos tratamientos .....	141
5.1.9.	Evaluación de la capacidad trombogénica de las plaquetas asociada a micropartículas.....	141
5.1.10.	Estudio de la capacidad procoagulante del plasma .....	145
5.2.	Estudio longitudinal.....	146
5.2.1.	Características de los pacientes .....	146
5.2.2.	Recuento de plaquetas en los distintos grupos .....	149
5.2.3.	Evaluación de los niveles de trombopoyetina antes y después de recibir tratamiento.....	149
5.2.4.	Estudio del número de plaquetas inmaduras en los distintos grupos antes y después de responder a tratamiento .....	150
5.2.5.	Estudio de la capacidad de activación de las plaquetas antes y después de responder a los tratamientos .....	151
5.2.6.	Estudio de la apoptosis de las plaquetas.....	153
5.2.7.	Evaluación de la capacidad trombogénica asociada a la fosfatidilserina de las micropartículas .....	154

5.2.8.	Evaluación de la capacidad trombogénica asociada al plasma .....	155
5.2.9.	Estudio de los niveles plasmáticos de APRIL .....	156
5.3.	Caso clínico .....	156
<b>6.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>161</b>
6.1.	Estudio transversal de las plaquetas de pacientes sometidos a distintos tratamientos.....	163
6.1.1.	Recuento de plaquetas en los distintos grupos .....	163
6.1.2.	Niveles de trombopoyetina en los pacientes sometidos a distintos tratamientos.....	164
6.1.3.	Número de plaquetas inmaduras en los distintos grupos .....	165
6.1.4.	Niveles plasmáticos de APRIL .....	166
6.1.5.	Estudio de la funcionalidad plaquetaria.....	167
6.1.6.	Estudio de la apoptosis en las plaquetas.....	168
6.1.7.	Evaluación de la capacidad trombogénica de las plaquetas asociada a micropartículas.....	168
6.1.8.	Actividad procoagulante del plasma .....	170
6.1.9.	Seguimiento de un paciente esplenectomizado .....	170
6.2.	Estudio longitudinal.....	171
6.2.1.	Recuento de plaquetas en los distintos grupos .....	171
6.2.2.	Evaluación de los niveles de trombopoyetina en los pacientes antes y después de recibir tratamiento.....	172
6.2.3.	Plaquetas inmaduras en los distintos grupos antes y después de responder a tratamiento.....	172

6.2.4.	Estudio de la capacidad de activación de las plaquetas antes y después de responder a los tratamientos .....	173
6.2.5.	Estudio de la apoptosis en las plaquetas.....	174
6.2.6.	Evaluación de la capacidad trombogénica asociada a la fosfatidil-serina de las micropartículas .....	174
6.2.7.	Evaluación de la capacidad trombogénica asociada al plasma.....	175
6.2.8.	Estudio de los niveles plasmáticos de APRIL .....	176
6.3.	Caso clínico .....	177
<b>7.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>181</b>
<b>8.</b>	<b>Referencias .....</b>	<b>185</b>
<b>9.</b>	<b>Publicaciones.....</b>	<b>199</b>

# **ABREVIATURAS**

**Abreviaturas**

A-AR-TPO: antes de tratamiento con agonistas de TPO

AC: Anticuerpos

ADP: Adenosín difosfato

AEMPS: Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios

A-IGIV: antes de tratamiento con inmunoglobulinaas

ALT: Alanina-aminotransferasa

AP: Altura del pico

APRIL: Ligando Inductor de la Proliferación del Linfocito B

ARN: Ácido ribonucleico

AR-TPO: Agonistas del Receptor de la Trombopoyetina

AST: Aspartato-aminotransferasa

AT: Antitrombina

ATP: Adenosin trifosfato

BAFF: Factor Activador de Linfocitos B

BAFF-R: Receptor para el BAFF

BCMA: Antígeno de Maduración de Células B

Bregs: Células B reguladoras

CAT: Trombinografía automática calibrada

CDs: Células dendríticas

CPA: Célula Presentadora de Antígenos

D-AR-TPO: después de tratamiento con agonistas de TPO

D-IGIV: después de tratamiento con inmunoglobulinaas

DXM: Dexametasona

EAs: Efectos adversos

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EPO-R: Receptor de la eritropoyetina

ESPL: esplenectomía

ETP: Potencial Endógeno de Trombina

eTPO: Trombopoyetina endógena

F: Factor

FAL: Fosfatasa alcalina

Fc: Fracción constante

FT: Factor Tisular

FcγRs: Receptores para la fracción constante de las Inmunoglobulinas

FITC: 5-isotiocianato de Fluoresceína

FVW: Factor Von Willebrand

GP: Glicoproteína

HLA: Antígeno Leucocitario Humano

IGIV: Inmunoglobulinas intravenosas

IL: Interleukina

IWG: International Working Group

JAK: Proteínas Janus kinasa

L: Litro

LAMP: Proteínas asociadas a la membrana liposomal

Min: Minutos

MF: Mielofibrosis

MKs: Megacariocitos

MO: Médula ósea

MPs: Micropartículas

MPPs: Micropartículas derivadas de plaquetas

NK: Natural killer

NMPs: Neoplasias mieloproliferativas

NO: Óxido nítrico

PAI-1: Inhibidor del Activador del Plasminógeno de tipo 1

PAR-1: Receptor Activado por Proteasa de tipo 1

PBS: Tampón fosfato salino

PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas

PE: Ficoeritrina

PFP: Plasma libre de plaquetas

PGI<sub>2</sub>: Prostaglandina I<sub>2</sub>

PI3K: Fosfatidil inositol kinasa 3

PLs: Fosfolípidos

PPP: Plasma pobre en plaquetas

PR: Plaquetas reticuladas

PRD: Prednisona

PRP: Plasma rico en plaquetas

PS: Fosfatidilserina

PSGL-1: Ligando Glicoproteico 1 de la P-selectina

PTI: Trombocitopenia Inmune

RC: Respuesta completa

rFVIIa: Factor VII recombinante activado

rh-TPO: Trombopoyetina humana recombinante

R-TPO: Receptor de la trombopoyetina

SEHH: Sociedad Española de Hematología y Hematerapia

SIN TTO: sin tratamiento

SMD: Síndrome mielodisplásico

TAP: Tiempo al pico

TCR: Receptor de linfocitos T

TE: Trombocitemia esencial

TFPI: Inhibidor del Factor Tisular

TGF $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta

TGT: Test de Generación de Trombina

Th: linfocitos T colaboradores

TL: Tiempo de latencia

TLR: Receptores *toll-like*

TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ .

TPO: Trombopoyetina

TRAP: Péptido Activador del Receptor de la Trombina

Treg: Linfocito T regulador

TVP: Trombosis venosa profunda

TXA<sub>2</sub>: Tromboxano A<sub>2</sub>

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascularVHC: virus de la hepatitis C

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana



# **LISTA DE FIGURAS**

**Lista de Figuras**

Figura 1.	Mecanismo por el que el citoesqueleto produce proplaquetas y libera plaquetas .....	31
Figura 2.	Producción de las plaquetas .....	33
Figura 3.	Rasgos ultraestructurales de plaquetas discoides al ser observadas en finas secciones mediante microscopía electrónica .....	38
Figura 4.	Receptores situados en la superficie de las plaquetas .....	42
Figura 5.	Integrina IIb $\beta$ 3 .....	46
Figura 6.	Vías de apoptosis celular .....	53
Figura 7.	“ <i>Blebbing</i> ” en la membrana del megacariocito .....	56
Figura 8.	Contenido y diana de las micropartículas .....	58
Figura 9.	Esquema del desbalance inmune en trombocitopenia inmune .....	70
Figura 10.	Patogenia de la trombocitopenia inmune .....	72
Figura 11.	Efecto de las inmunoglobulinas intravenosas en el sistema inmune .....	81
Figura 12.	Mecanismo de acción de los agonistas de la trombopoyetina .....	93
Figura 13.	Ejemplo de gráfico que se obtiene en la Trombinografía Automatizada ...	122
Figura 14.	Recuento de plaquetas en los distintos grupos sometidos a estudio .....	136
Figura 15.	Niveles plasmáticos de trombopoyetina en los distintos grupos sometidos a estudio determinado por ELISA .....	137
Figura 16.	Porcentaje de plaquetas reticuladas en los distintos grupos sometidos a estudio determinado por citometría de flujo .....	137
Figura 17.	Niveles plasmáticos de APRIL en los distintos grupos sometidos a estudio determinado por ELISA .....	138
Figura 18.	Unión de PAC1 a la superficie de las plaquetas .....	139

Figura 19. Expresión de P-selectina en la superficie de las plaquetas. ....	139
Figura 20. Expresión del receptor del fibrinógeno en la superficie de las plaquetas .....	140
Figura 21. Exposición de fosfatidilserina en la superficie de las plaquetas .....	141
Figura 22. Actividad procoagulante debida a micropartículas.....	142
Figura 23. Evolución de la hemostasia en una paciente esplenectomizada .....	144
Figura 24. Test de generación de trombina .....	145
Figura 25. Recuento de plaquetas en los distintos grupos.....	149
Figura 26. Niveles plasmáticos de trombopoyetina en los distintos grupos sometidos a estudio determinados por ELISA .....	150
Figura 27. Porcentaje de plaquetas reticuladas .....	150
Figura 28. Unión de PAC1 a la superficie de las plaquetas.....	151
Figura 29. Expresión de P-selectina en la superficie de las plaquetas .....	152
Figura 30. Expresión del receptor del fibrinógeno en la superficie de las plaquetas .....	153
Figura 31. Unión de anexina V a la superficie de las plaquetas .....	154
Figura 32. Actividad procoagulante asociada a la fosfatidilserina de las micropartículas .....	154
Figura 33. Actividad procoagulante del plasma .....	155
Figura 34. Niveles plasmáticos de APRIL en los distintos grupos.....	156
Figura 35. Recuento de plaquetas, episodios hemorrágicos y tratamiento en la evolución del paciente.....	159
Figura 36. Evaluación de la activación plaquetaria en el paciente determinada por citometría de flujo antes y después de responder al tratamiento.....	159
Figura 37. Expresión del receptor del fibrinógeno en la superficie de las plaquetas del paciente antes y después de responder a tratamiento .....	160

# **LISTA DE TABLAS**

**Lista de Tablas**

Tabla 1. Causas de trombopenia adquirida de origen periférico .....	63
Tabla 2. Pruebas complementarias recomendadas para el diagnóstico de la trombocitopenia inmune.....	76
Tabla 3. Ventajas e inconvenientes de la trombinografía automática calibrada. ....	121
Tabla 4. Características clínicas y demográficas de los pacientes tratados con corticoides .....	130
Tabla 5. Características clínicas y demográficas de los pacientes tratados con inmunoglobulinas.....	132
Tabla 6. Características clínicas y demográficas de los pacientes tratados con agonistas de la trombopoyetina.....	133
Tabla 7. Características clínicas y demográficas de los pacientes sin tratamiento para la trombocitopenia inmune en el momento del estudio.....	134
Tabla 8. Diferenciación del origen de micropartículas en los pacientes esplenectomizados.....	143
Tabla 9. Seguimiento del recuento de micropartículas en una paciente esplenectomizada .....	143
Tabla 10. Características clínicas y demográficas de los pacientes tratados con inmunoglobulinas (antes y después de responder al tratamiento).....	146
Tabla 11. Características clínicas y demográficas de los pacientes tratados con agonistas de la trombopoyetina (antes y después de responder al tratamiento).....	148

# RESUMEN

## ANTECEDENTES

La trombocitopenia inmune (PTI) es una patología de origen inmune caracterizada por una trombocitopenia aislada (cifra de plaquetas  $< 100 \times 10^9/L$ ), que no puede ser justificada por otra patología (infecciosa, central, por otras patologías autoinmunes o hematológicas), siendo su diagnóstico de exclusión.

Tradicionalmente se asumió que el mecanismo etiopatogénico responsable de la PTI era la destrucción periférica de las plaquetas mediada por autoanticuerpos, pero el hecho de hasta en un 30% a 40% de pacientes no pudiera demostrarse la presencia de éstos llevó a pensar que existían otros mecanismos implicados en la patogenia de la enfermedad, como la disregulación de la megacariopoyesis o del sistema inmune.

La mayoría de los pacientes están asintomáticos o tienen una clínica hemorrágica mucocutánea leve, siendo poco frecuente que presenten manifestaciones hemorrágicas graves como hemorragia gastrointestinal, clínica mucocutánea extensa o hemorragia intracraneal. El hecho de que algunos pacientes a pesar de presentar una trombocitopenia grave no presenten síntomas hemorrágicos hace pensar que puedan existir algunos mecanismos compensatorios en la hemostasia de estos pacientes.

Por otro lado, se ha descrito una mayor incidencia de eventos trombóticos en estos pacientes lo que apoya la idea de que pudiera existir algún mecanismo que contribuya a la hemostasia en el plasma o las plaquetas de estos pacientes.

**OBJETIVO**

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar las características de la hemostasia en pacientes con PTI que responden a distintos tratamientos (inmunoglobulinas intravenosas (IGIV), corticoides, agonistas de la trombopoyetina (AR-TPO), esplenectomía). Para ello, en un estudio transversal, se analizaron distintos parámetros en los diferentes grupos: el recuento plaquetario, la regulación de la cifra de plaquetas por trombopoyetina (TPO); la producción de plaquetas reticuladas; la participación de la activación del sistema inmune en la destrucción de las plaquetas determinando los niveles plasmáticos de APRIL (ligando inductor de la proliferación del linfocito B); la capacidad de activación de las plaquetas mediante la expresión de diferentes marcadores de activación; el grado de apoptosis en las plaquetas; la capacidad procoagulante asociada a micropartículas (MPs); el número y capacidad trombogénica de las MPs, así como la capacidad procoagulante del plasma asociado a otros factores diferentes a las MPs.

Un objetivo secundario del trabajo fue evaluar en un subestudio longitudinal el efecto del tratamiento con inmunoglobulinas y agonistas de la trombopoyetina sobre las plaquetas, su funcionalidad, los niveles de APRIL y el estado procoagulante del plasma, realizando determinaciones de estos parámetros antes y después de responder al tratamiento, con el fin de evaluar las modificaciones en la hemostasia como consecuencia del tratamiento recibido.

Por último, presentamos un caso clínico que avala la importancia de conocer las características de las plaquetas en los pacientes con PTI refractaria con el fin de orientar el abordaje terapéutico de estos pacientes.



## MÉTODOS

Se incluyeron 138 pacientes diagnosticados de PTI crónica, 18 de los cuales no habían precisado nunca tratamiento para la PTI, y los 120 restantes habían precisado en algún momento tratamiento con IGIV, corticoides, esplenectomía, rituximab, romiplostim, eltrombopag, azatioprina o dapsona. Se incluyeron 87 controles sanos con distribuciones de edad y sexo similares a las de los grupos de pacientes.

En el estudio transversal se incluyeron 97 pacientes, 40 de ellos no recibían tratamiento en el momento del estudio (4 de ellos esplenectomizados). De los restantes, 22 estaban en tratamiento con corticoides, 18 con AR-TPO (14 con eltrombopag y 4 con romiplostim) y 17 con IGIV en el momento de extracción de la muestra.

En el estudio longitudinal se compararon las características de las plaquetas de los pacientes antes y después de responder al tratamiento con IGIV (28 pacientes) o con AR-TPO (13 pacientes).

Se analizó individualmente debido a sus características especiales el caso de un paciente particularmente refractario a distintas líneas terapéuticas.

Para evaluar la función plaquetaria, cuantificar las plaquetas reticuladas y detectar la presencia de cambios apoptóticos en la membrana plaquetaria, se utilizó la citometría de flujo. La capacidad procoagulante del plasma se determinó mediante un test de generación de trombina, la trombinografía calibrada automatizada (*CAT, Calibrated Automated Thrombogram, Thrombinoscope*). Para determinar la capacidad trombogénica asociada a MPs se empleó un método cromogénico utilizando los kits de MP-Activity y MP-FT-Activity de ZYMUPHEN.

La determinación de los niveles plasmáticos de TPO y APRIL se realizó mediante la técnica de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).

## **RESULTADOS**

Los pacientes con PTI que respondieron a los distintos tratamientos recuperaron el número de plaquetas sin alcanzar los niveles del grupo control, salvo en el caso de los pacientes esplenectomizados en que no difirió del mismo. Se observó que los niveles plasmáticos de TPO en los pacientes diagnosticados de PTI fueron más altos que en los controles, aunque se ha descrito que una alteración en la función de esta TPO. El número de plaquetas inmaduras fue más alto en los pacientes con PTI que en los controles, lo que traduce una médula ósea (MO) funcional pero ineficaz.

Los niveles de APRIL fueron más altos en los pacientes con PTI, lo que concuerda con la disregulación del sistema inmune observada en estos pacientes. En el grupo de pacientes esplenectomizados se observó una disminución de los mismos, aunque siguieron siendo más altos que en los controles sanos.

La capacidad de activación plaquetaria tras la activación del receptor de fibrinógeno con TRAP (agonista del receptor para trombina PAR-1) fue menor que la de los controles en todos los grupos. Sin embargo, esta disminución no se debió a una reducción en la expresión del receptor de fibrinógeno. Lo que traduce una alteración en la función plaquetaria a pesar de la recuperación en la cifra de plaquetas.

En el estudio longitudinal que realizamos observamos que las plaquetas de todos los pacientes con PTI, antes y después de responder a los tratamientos, mostraron que exponían más fosfatidilserina (PS). La exposición de PS es un indicador de activación o

apoptosis plaquetaria. El hecho que las plaquetas no recuperen su funcionalidad después de los tratamientos sugiere que en este caso el aumento en la exposición de PS se debe a un incremento en la apoptosis plaquetaria. Los niveles de APRIL disminuyeron en los pacientes con PTI que respondieron a los AR-TPO alcanzando los niveles observados en el grupo control, apoya la hipótesis de que estos fármacos poseen una acción inmunomoduladora añadida a su capacidad de estimulación de la megacariopoyesis.

Las plaquetas de todos los pacientes con PTI, antes y después de responder a los tratamientos, tenían mayor capacidad trombogénica asociada al plasma y a MPs, lo que puede tener un papel en la ausencia de clínica hemorrágica en los pacientes con trombocitopenia grave.

## **CONCLUSIONES**

1. El mecanismo etiopatogénico de la PTI es la suma de una destrucción periférica y de una disminución de la megacariopoyesis producida no sólo por un funcionamiento inadecuado de la TPO, sino por una compleja disregulación del sistema inmune. Estos pacientes presentan un número de plaquetas reticuladas o inmaduras mayor que los controles sanos, que probablemente traduce esa megacariopoyesis parcialmente ineficaz que trata de compensar la destrucción periférica. Las plaquetas tienen una menor capacidad de ser activadas por agonistas que parece deberse a un aumento en su apoptosis. Presentan un aumento en la capacidad procoagulante del plasma, así como de la asociada a MPs.

2. La respuesta al tratamiento con IGIV o AR-TPO de los pacientes con PTI conlleva una recuperación en la cifra de plaquetas, aunque no implica una modificación en los niveles

de TPO, ni mejora de la funcionalidad plaquetaria y tampoco aumenta el riesgo de trombosis. Los niveles de APRIL disminuyeron en los pacientes con PTI que respondieron a los AR-TPO, lo que podría indicar que posean una actividad inmunomoduladora además de su efecto estimulante de la producción de plaquetas.

3. Es importante conocer las características de las plaquetas en los pacientes con PTI refractaria, dado que la glicoproteína(GP) contra la que vayan dirigidos los anticuerpos (Ac) puede condicionar la eficacia del tratamiento administrado.

# **1.INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Recuerdo histórico del estudio de las plaquetas

La primera vez que se hizo referencia a las plaquetas en una publicación fue en 1841, cuando Addison las describió como unos “gránulos diminutos”, que formaban parte del denominado “polvo de la sangre”, del cual se desconocía su función[1].

En 1865 Max Schultze las describe por primera vez. En su trabajo estudió los diferentes tipos de leucocitos y su capacidad fagocitaria, pero además identificó otros corpúsculos que denominó “*spherules*”. Estos últimos eran pálidos, de pequeño tamaño, hasta 6-8 veces menores que los eritrocitos, con “rayos” de protoplasma fino y granular emergiendo de ellas y que tendían a agruparse [2].

Posteriormente es Hayem, un experto en anemias hemolíticas, quien publica otros estudios acerca de la morfología de esas “vesículas” nombradas por Schultze. Hayem, las consideró los precursores de los hematíes denominándolas hemoblastos. Las denominó “eritrocitos pálidos”, pequeños corpúsculos semejantes a los hematíes, que se volvían de un color más rojizo al absorber hemoglobina. Observó que modificaban su forma rápidamente haciéndose espinosos y adherentes al vidrio, y que mostraban una tendencia a pegarse unos a otros formando agregados[3].

Pero la primera descripción exhaustiva de las plaquetas aclarando el significado de las mismas la realizó Bizzozero en 1882, el cual las considera el tercer elemento forme de la sangre, diferente a los eritrocitos o los leucocitos. Las denominó “*petit plaques*” o “*plaquettes*”. Las describió como corpúsculos discoides anucleados, constituídos por una membrana, y una matriz en la que se encontraban dispersos diversos gránulos, de forma redonda u oval, con un diámetro dos a tres veces menor que el de los eritrocitos.

Además de su morfología fue el primero en demostrar el papel de las plaquetas en la coagulación, destacando su importante contribución en los fenómenos de la trombosis y de la hemostasia. Describió cómo circulaban en la sangre arrastradas por el flujo sanguíneo, cómo se detenían en el sitio de la lesión si ésta existía, primero unas pocas, y en pocos segundos cientos, y cómo se depositaba sobre ellas material fibroso [4].

Pero no es hasta 1906 cuando James Horner Wright las describe como fragmentos del citoplasma de los megacariocitos (MKs) y establece a éstos últimos como los elementos básicos de la megacariopoyesis [1].

Recientemente Collier publicó un artículo en que clasificaba en distintas eras la investigación en el campo de las plaquetas, dividiéndolo en “periodo descriptivo” que se extendería desde 1880-1960, “periodo mecanístico” que agruparía los últimos cincuenta años desde 1960, este último periodo lo considera la Edad de Oro de la investigación plaquetar, debido a las importantes contribuciones al conocimiento realizadas en este periodo.

Indicaba en su publicación que estamos entrando en una nueva era, otro punto de inflexión en el estudio de las plaquetas, debido a las nuevas técnicas de que disponemos biofísica molecular, biología celular, biología molecular celular, biología estructural, simulaciones computacionales y todas las nuevas técnicas denominadas con el sufijo –ómica [5].

## 1.2. Generalidades de las plaquetas

Las plaquetas son los elementos formes más pequeños de la sangre con un diámetro de entre 2-5  $\mu\text{m}$ , un grosor de 0.5  $\mu\text{m}$  y un volumen medio de 6- 10 fl. Circulan en sangre

en un número entre 150 a 300 x 10<sup>9</sup> /L en individuos sanos, con una vida media de unos diez días.

Además de su participación fundamental en los procesos de trombosis y hemostasia, recientemente se está investigando su papel en otros procesos fisiopatológicos como inflamación, aterogénesis, defensa frente a agentes microbianos y crecimiento tumoral y metástasis [6].

En condiciones normales circulan por el torrente sanguíneo en un estado de “reposo”, pero son activadas rápidamente en caso de lesión vascular. Esta activación plaquetar se ve estimulada por exposición de moléculas de la matriz extracelular o agonistas plaquetarios solubles, que inducen la activación de señales intracelulares al unirse a sus correspondientes receptores. Dichas señales llevan a la reorganización del citoesqueleto y liberación del contenido procoagulante de los gránulos plaquetarios, así como la activación de integrinas de origen plaquetar, que actúan como mediadores para la adhesión a la matriz extracelular. En este proceso de activación plaquetaria, se producen una serie de cambios conformacionales a nivel de las plaquetas, pasan de ser discoideas a esferoidales para posteriormente adoptar una forma de “huevo frito” que se adhiere a la superficie dañada. Tras la activación el anillo formado por los microtúbulos responsables de mantener la forma discoide de las plaquetas en situación basal se contrae y tiene lugar un acortamiento de los filamentos de actina. Posteriormente se produce una polimerización extensiva de la actina, formándose múltiples “*filipodia*”. Las plaquetas se expanden, formando “*lamellipodia*” y adhiriéndose entre sí progresivamente.

Es fundamental la unión entre los filamentos del citoesqueleto y la matriz extracelular para lograr una adhesión estable[7].



### 1.2.1. **Producción de las plaquetas. Megacariopoyesis**

La megacariopoyesis comprende una serie de procesos que van desde la especialización de las células madre hematopoyéticas pluripotenciales hacia los megacarioblastos, que son los progenitores de los megacariocitos, hasta la formación de las plaquetas.

Los megacariocitos derivan de las células madre hematopoyéticas que residen fundamentalmente en la MO, pero también están presentes en el saco vitelino, hígado fetal y bazo en el desarrollo temprano. Son las células más grandes (50-100  $\mu\text{m}$ ) y unas de las más raras en la médula ósea, representando aproximadamente un 0.01% de las células nucleadas en la médula ósea. Cada uno de ellos puede dar lugar a unas 10-20 proplaquetas.

La formación de plaquetas podría dividirse en dos fases: la primera, de desarrollo y maduración de los megacariocitos que dura algunos días y precisa de factores de crecimiento específicos; y la segunda en la que se generarían las plaquetas tras ser remodelado el citoplasma del megacariocito inicialmente para dar proplaquetas y posteriormente preplaquetas, que tras diversos procesos de fisión darían lugar a las plaquetas, esta segunda fase es más rápida que la primera y puede durar unas horas. En conjunto el tiempo aproximado desde que un megacariocito inicia el proceso de poliploidización, maduración y liberación de plaquetas puede ser de unos cinco días. Durante la maduración de los megacariocitos éstos aumentan su tamaño, se van rellenando de gránulos plaquetares específicos y proteínas que formarán el citoesqueleto, y desarrollarán un tortuoso sistema membranoso con numerosas invaginaciones.

El regulador principal del crecimiento y desarrollo de los MKs es la TPO, que se une específicamente a c-Mpl, su receptor en los MKs. Mediante el estímulo de TPO los MKs

se transforman en poliploides, a través de una serie de procesos de replicación de ADN sin división celular. Los MKs en un primer momento sufren un estado proliferativo  $2n$  en el que su progreso por el ciclo celular es similar al de otras células, a continuación comienzan un proceso de endomitosis acumulando contenido de  $4n$ ,  $8n$ ,  $16n$ ,  $32n$ ,  $64n$  y hasta  $128n$  en un único núcleo polilobulado antes de iniciar su maduración y formación de proplaquetas. Este segundo proceso de endomitosis se debe a una incompleta formación del anillo contráctil de miosina II y F-actina que generaría la fuerza necesaria para la separación celular. La regulación negativa de MYH10 no muscular (cadena pesada de miosina IIB) en el anillo contráctil a través de RUNX1 (factor de transcripción 1 relacionado con runt) es necesaria para el paso de mitosis ( $2n$ ) a endomitosis.

Existe la teoría de que los MKs son poliploides para producir gran cantidad de ARNm (ARN mensajero) y las proteínas necesarias para ser colocadas en las plaquetas, manteniendo su capacidad para realizar múltiples funciones sin el estrés de la mitosis o citoquinesis.

Uno de los objetivos de la endomitosis es la generación de gran cantidad de lípidos y proteínas necesarios para la creación del sistema de membrana, que consiste en un complejo sistema de cisternas y túbulos distribuidos a través del citoplasma del MK que tiene una continuidad con la membrana plasmática y cuyo fin es actuar como reservorio de membrana para la formación de la proplaqueta. Esta membrana sería el origen de la superficie plaquetar y de las proplaquetas[8].

El citoesqueleto que da soporte a la membrana del megacariocito estaría compuesto de espectrina, que formaría un entramado bidimensional que estabilizaría dicha membrana.

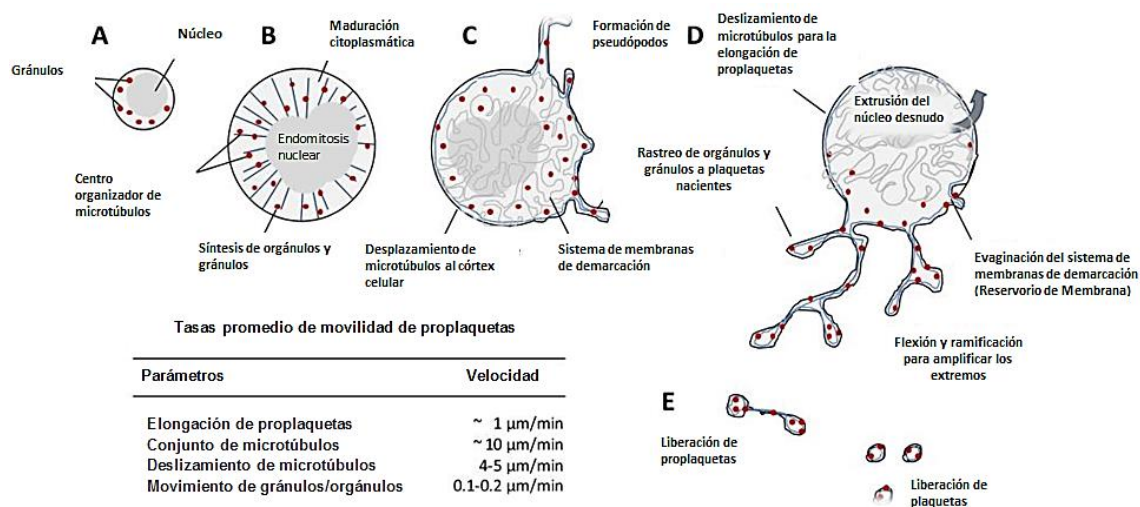
El megacariocito maduro da lugar a proliferaciones que se introducen en la vasculatura sinusoidal de la MO denominadas proplaquetas. La reorganización de la  $\beta 1$ -tubulina, isoforma fundamental de la tubulina en los MKs, es fundamental para la formación de las proplaquetas, ya que empleando dineína citoplasmática estimula su elongación. Estos microtúbulos que son el eje de las proplaquetas también cumplen un importante papel en el transporte de organelas y gránulos al interior de las mismas.

Recientemente en un estudio in vivo llevado a cabo en ratones se ha sugerido que en el proceso de maduración de los MKs no sólo se producirían las protusiones de fino calibre que dan lugar a las proplaquetas, sino que también otras de mayor grosor, que no son susceptibles a la elongación por el flujo, cuya estructura es similar a los MKs, y que se producirían fundamentalmente en situaciones en que se requiere masa plaquetaria de forma urgente (pérdida ante episodios de sangrado, anticuerpos antiplaquetas...). Por tanto la demanda plaquetaria modularía directamente el tipo de protusiones intravasculares que se generarían a partir del megacariocito[9].

El nicho en la MO tiene un papel fundamental en la megacariopoyesis, el microambiente medular juega un papel muy importante en el desarrollo de las proplaquetas y en la liberación de las plaquetas. Se ha descrito al colágeno I como el componente fundamental del nicho medular en los osteoblastos. Así si este colágeno I se une mediante la integrina  $\alpha 2 \beta 1$  a los MKs se inhibe la formación de proplaquetas; esto indica que en circunstancias fisiológicas el nicho osteoblástico inhibe la formación de proplaquetas permitiendo la diferenciación y maduración de los MKs.

Los MKs poliploides se localizan en las células endoteliales de la MO, donde dan lugar a proplaquetas que migran a través de dichas células y liberan las plaquetas que se forman a nivel de la vasculatura sinusoidal. Este nicho vascular está compuesto por proteínas de

la matriz extracelular como colágeno IV, fibronectina, fibrinógeno y Factor von Willebrand (FvW), estas proteínas junto a las interacciones de los progenitores mediadas por quimiocinas permiten al MK recolocarse en un microambiente que sea más permisivo para las últimas fases de maduración y formación de proplaquetas.



**Figura 1. Mecanismo por el que el citoesqueleto produce proplaquetas y libera plaquetas.** A) Célula inmadura. B) Maduración del MK. C) Traslocación de los microtúbulos a la corteza celular. D) Deslizamiento de microtúbulos superpuestos dan lugar a la elongación y formación de proplaquetas con organelas en su interior. E) El citoplasma del MK es transformado en una masa de proplaquetas que son liberadas de la célula. Al elongarse las proplaquetas los grupos de microtúbulos se reorganizan, formando ovillos en los extremos de las proplaquetas donde se engarzan los gránulos y las organelas. Mediante movimientos de deslizamiento de los microtúbulos, se produce la elongación de las proplaquetas, produciéndose su liberación (Adaptado de Thon, J.N. and J.E. Italiano, *Platelet formation*. Semin Hematol, 2010. 47(3): p. 220-6.)

Asimismo, el fibrinógeno es un componente fundamental de la matriz celular en los sinusoides de la MO, que estimula la formación de proplaquetas al unirse al receptor  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  del MK.

Por otro lado, la fibronectina, una proteína abundante en el microambiente medular, juega un papel fundamental en la megacariopoyesis, proliferación y diferenciación a

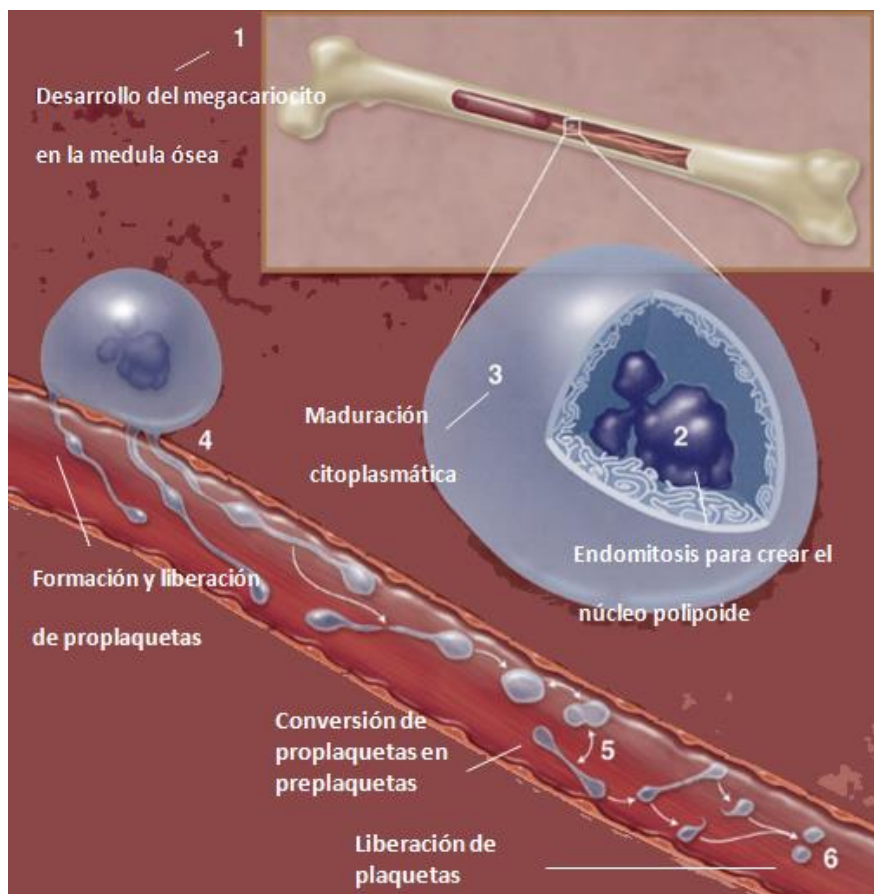
través de la unión a los receptores de fibronectina VLA-4 y VLA-5, que al activarse contribuyen a la formación de proplaquetas.

Por lo tanto, podemos decir que el nicho osteoblástico proporciona un microambiente que permite a los MKs madurar y desarrollarse, mientras que el nicho vascular los estimula para la producción de proplaquetas[10].

Los MKs emiten podosomas, estructuras cilíndricas ricas en actina que se encuentran en la superficie externa de la membrana plasmática, que degradarían la matriz extracelular permitiendo la extensión de protusiones de proplaquetas a través de la membrana[11].

Se ha sugerido que estos podosomas pueden tener un papel fundamental en la liberación de las plaquetas al torrente sanguíneo en su proceso de formación.

La liberación al torrente sanguíneo de estos fragmentos que protuyen del MK se ve favorecido por la fuerza del torrente circulatorio en los sinusoides medulares. Una vez liberada esta sustancia heterogénea al torrente sanguíneo, continúa el proceso de maduración, transformándose inicialmente en preplaquetas, que son elementos anucleados, discoides, de 2-10  $\mu\text{m}$ , que pueden transformarse en "*barbell shaped proplatelets*" que consiste en una polimerización bidireccional de microtúbulos que da lugar en cada uno de los extremos de la proplaqueta a una especie de bobina de microtúbulos del tamaño de una plaqueta que se dividirían en dos plaquetas[10, 12].



**Figura 2. Producción de las plaquetas.** 1) Diferenciación de las células madre hematopoyéticas en MKs en la MO. 2) Endomitosis de los MKs hasta formación de un núcleo con 128n. 3) Formación de invaginaciones en la membrana alrededor del citoplasma del MK. 4) Migración de los MKs al nicho vascular, donde generan proplaquetas que son liberadas a los sinusoides .5) En el torrente sanguíneo las proplaquetas se transforman en preplaquetas.6) Las “barbell shaped proplatelets” se dividen dando lugar a dos plaquetas (Adaptada Machlus, K.R. and J.E. Italiano, Jr., *The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation*. J Cell Biol, 2013. 201(6): p. 785-96.)

El tamaño que alcanzará la plaqueta se correlaciona con la reactividad plaquetaria, plaquetas de mayor tamaño tienen más potencial protrombótico. Un volumen plaquetar alto se ha correlacionado con un aumento en su capacidad de agregación, un aumento en la expresión de moléculas de adhesión y un mayor riesgo cardiovascular y de patología arterial periférica.

Aunque tradicionalmente se ha considerado a la MO el principal lugar de producción de plaquetas, un estudio llevado cabo recientemente por Lefrancais y cols, ha sugerido que el pulmón podría contribuir de forma importante a la biogénesis de las plaquetas. Este

estudio llevado a cabo en ratones, se ha observado que en la microcirculación pulmonar se observan gran cantidad de MKs liberando plaquetas activamente. Estos MKs provenían de localizaciones extrapulmonares, probablemente habrían migrado desde la MO. Esta contribución a la trombogénesis probablemente supondría un 50 % de la producción de plaquetas, implicando una cifra de unos diez millones de plaquetas por hora. Asimismo, este grupo ha identificado subpoblaciones de MKs maduros e inmaduros y células precursoras hematopoyéticas en el espacio extravascular de los pulmones que, en circunstancias de necesidad, como cuando existe trombocitopenia, podrían migrar a la MO y reconstituir no sólo la cifra de plaquetas circulantes, sino contribuir a la repoblación de las otras líneas celulares. Concluyen que podría considerarse al pulmón como un lugar primario de trombogénesis y un órgano con un considerable potencial trombopoyético[13].

Actualmente se están llevando a cabo estudios empleando terapia génica con el fin de mediante la manipulación de los MKs tratar de corregir alteraciones congénitas de las plaquetas o permitir a las plaquetas el transporte de agentes terapéuticos directamente a los lugares de lesión (agentes antioncogénicos en células tumorales) con el fin de confinar la administración de quimioterapia al lugar de lesión[14].

### **1.2.2 La trombopoyetina y su receptor**

La TPO es el regulador principal de la producción de plaquetas. Su existencia fue demostrada por primera vez en 1994 [15]. Su síntesis es fundamentalmente a nivel de las células del parénquima hepático, y en menor medida a nivel renal o en MO. Actúa amplificando la producción basal de MKs y plaquetas. Al unirse a su receptor previene la apoptosis de los megacariocitos y aumenta su número, tamaño y ploidía. En pacientes

con trombocitopenia, con un número insuficiente de plaquetas circulantes, se elevan los niveles de TPO, para estimular la producción de MKs y de plaquetas. Por tanto, podríamos decir que los niveles de TPO son inversamente proporcionales a la tasa de producción de plaquetas.[16]

El receptor de la TPO (TPO-R), también conocido como MPL fue identificado por primera vez en 1992, curiosamente antes que su ligando, la TPO. La TPO se une a la porción extracelular del TPO-R, condicionando cambios en el mismo e iniciando la cascada de señales en la célula. El TPO-R al no tener actividad quinasa intrínseca utiliza la familia de proteínas Janus quinasa (JAK) para transducir la señal desde la citoquina extracelular al núcleo celular. JAK2 y TYK2 (pertenecientes a la familia JAK), se unen al extremo citoplasmático de TPO-R y son fosforilados a través de la señal TPO. Estas JAKs una vez activadas fosforilan al propio receptor, así como al transductor de señales y activador de transcripción (STAT) 1, 3 y 5 y pueden activar a las vías de protein-kinasa mitógeno activada (MAPK) y fosfatidil-inositol kinasa 3 (PI3K).

TPO-R se expresa fundamentalmente en la superficie de los MKs, plaquetas, hemangioblastos y células madre hematopoyéticas (HSCs). Por tanto, sus funciones fundamentales son por un lado la regulación de la producción de plaquetas, y por el otro el mantenimiento de las HSCs.

Cuando existe un déficit de este receptor en humanos, resulta en una trombocitopenia amegacariocítica congénita. Sin embargo, otras mutaciones en MPL se han identificado en patologías como trombocitosis familiar o neoplasias mieloproliferativas (NMPs) como trombocitemia esencial (TE) o mielofibrosis (MF).



### Estructura de TPO-R:

Se compone de tres dominios funcionales:

- Porción extracelular: se supone que tiene una organización similar al receptor de la eritropoyetina (EPO-R), salvo que está compuesto por dos pares de dominios adyacentes fibronectina III-like; cada uno de dichos dominios consiste en una serie de 7 hebras  $\beta$  antiparalelas que se apilan en un  $\beta$ -sandwich.
- Dominio transmembrana: es una sección helicoidal del receptor que sirve para anclarlo a la superficie celular. Diversas mutaciones en esta región del receptor se han asociado a diversas patologías TE, MF o trombopenia hereditaria.
- Dominio citoplasmático: es la porción del receptor que se extiende hasta el citoplasma y es la que une JAKs, así como interacciona con otras proteínas intracelulares.

Se han desarrollado en los últimos años dos AR- TPO uno de ellos es romiplostim que es un péptido que mimetiza la TPO, con gran afinidad por el TPO-R, y el otro eltrombopag que no se une al receptor de la misma forma que la TPO endógena, sino que se une al dominio transmembrana. Ambos se han aprobado para el tratamiento de la PTI crónica. Un tercer grupo de AR-TPO con potenciales utilidades clínicas actualmente en estudio, serían los “*minibodies*” y “*diabodies*”[17].

### **1.2.3 Estructura de las plaquetas**

Las plaquetas son los elementos formes más pequeños de la sangre con un tamaño de entre 2-5  $\mu\text{m}$ . Circulan en el torrente sanguíneo en un estado quiescente, estando su activación inhibida por el óxido nítrico (NO) y las prostaglandinas liberadas por las células endoteliales. Habitualmente en situación de reposo tienen una forma discoidea, mantenida gracias al anillo de microtúbulos situado bajo su membrana. Tras la activación dicho anillo se contrae, adoptando una forma redondeada y emitiendo pseudópodos.

#### **1.2.3.1 Membrana plaquetaria**

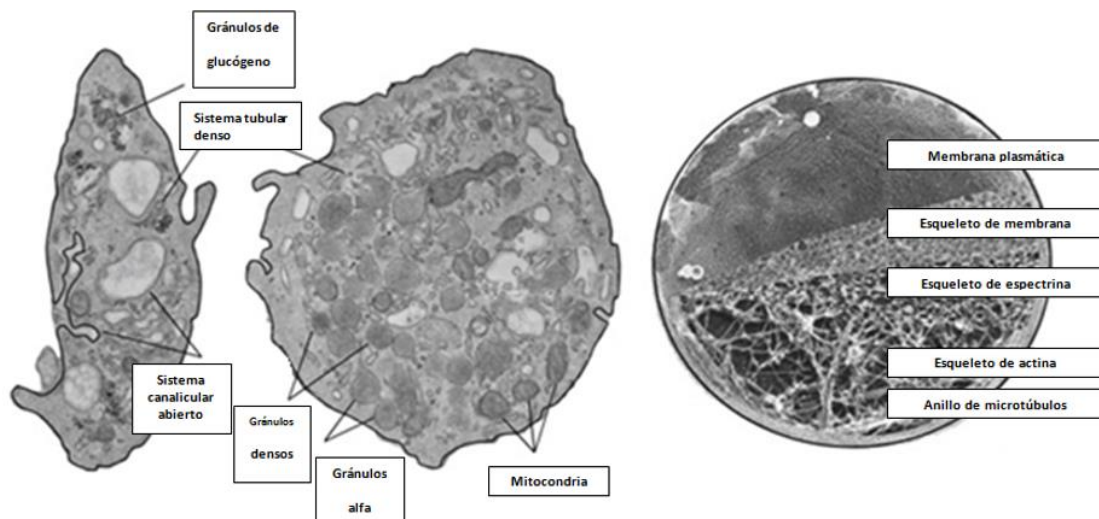
La membrana plaquetar cuando es observada con microscopía electrónica de alta resolución tiene un aspecto arrugado con muchas pequeñas dobleces y aperturas del sistema canalicular abierto distribuídas aleatoriamente.

Esta membrana plaquetar se divide en tres capas:

- El glicocáliz, la más externa de ellas, compuesta por GPs necesarias para la interacción con estructuras subendoteliales de la pared vascular dañada, para la activación plaquetar, la adhesión y la agregación, así como para la retracción del coágulo. En esta superficie se encontrarían ampliamente expresados los receptores GPIb/V/IX y la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  fundamentales para el mantenimiento de la hemostasia.
- La bicapa lipídica, situada por debajo del glicocáliz, que es poco compresible y no admite el estiramiento, de ahí que para compensar este defecto en los momentos en que existe el cambio conformacional plaquetar y se produce la expansión de la plaqueta, se requieran esas pequeñas dobleces de la superficie plaquetar y las porciones de membrana internalizadas del sistema canalicular

abierto. Esta bicapa tiene un aspecto similar al resto de membranas de otras células sanguíneas, aunque juega un papel fundamental en la hemostasia. Contiene factor tisular (FT), que es liberado en micropartículas (MP) al activarse la plaqueta, capaces de unir los factores de coagulación Va, VIIa y Xa a su superficie, de este modo se intensifica la producción de trombina a nivel de la superficie de las plaquetas activadas y MPs de origen plaquetar.

- El área submembranosa, bajo la bicapa lipídica, que contiene un sistema de filamentos de actina (citoesqueleto) necesario para el cambio conformacional de la plaqueta y la traslocación de receptores y partículas sobre la superficie plaquetar. En este compartimento los dominios citoplasmáticos de todos los receptores transmembrana interaccionan con proteínas [6].



**Figura 3. Rasgos ultraestructurales de plaquetas discoides al ser observadas en finas secciones mediante microscopía electrónica.** Corte transversal y longitudinal. (Adaptada de Thon, J.N. and J.E. Italiano, *Platelet formation*. Semin Hematol, 2010. 47(3): p. 220-6)

### 1.2.3.2 Zona sol-gel

Se denomina zona sol-gel a la matriz viscosa transparente que se encuentra bajo la membrana plaquetar, en ella se encuentra un sistema de microtúbulos y microfilamentos distribuidos de manera organizada.

El citoesqueleto está formado por microtúbulos que se encuentran enrollados situados cerca de la pared celular, conformando este sistema que contribuye a la contractilidad de la plaqueta.

Los microfilamentos de actina de esta zona forman el citoesqueleto que contiene la matriz en la que están suspendidas las distintas organelas contenidas en la plaqueta separándolas entre sí y de la pared celular en condiciones de reposo. Cuando tiene lugar la activación plaquetaria este sistema de filamentos de actina contrae los microtúbulos movilizandolos los gránulos  $\alpha$  y los gránulos densos al centro de la plaqueta, para liberar su contenido a través del sistema canalicular abierto.

En el citoplasma se encuentran diversas organelas entre las que destacan:

- Gránulos  $\alpha$ : de forma oval, con un diámetro de entre 200 a 500 nm. Se encuentran en un número de 50-80 por plaqueta, siendo la organela más frecuente. En su zona submembranosa contienen FvW, en la zona periférica proteínas sintetizadas en los MKs como el FV de la coagulación, trombospondina, P-selectina y FvW, así como proteínas sintetizadas en el exterior de las plaquetas. Las proteínas contenidas en estos gránulos son transportadas desde el retículo endoplásmico a través del sistema de Golgi donde son reclutadas en gránulos inmaduros o por endocitosis, ya desde el MKs hasta la plaqueta madura. Este tráfico de membrana está regulado por distintas

proteínas como clatrina proteínas adaptadoras (AP) AP1, AP2 y AP3, la proteína de fusión N-etilmaleimida sensitive (NSF), receptores de proteínas de unión (SNAREs) y GTPasas monoméricas. Para ambas vías las vesículas recubiertas de clatrina se forman a través de invaginaciones de membrana bajo la influencia de AP. AP1 parece tener un papel fundamental en la vía de la síntesis, mientras que AP2 actúa como mediador en la endocitosis.

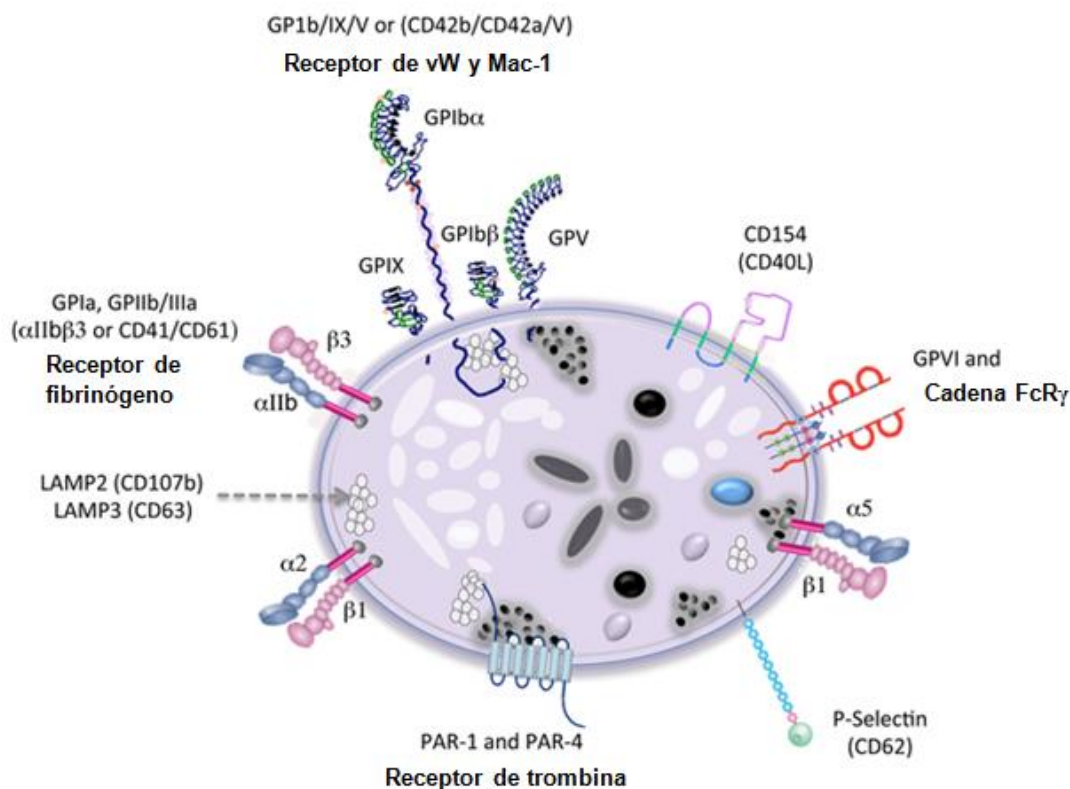
Estos gránulos contienen proteínas solubles que intervendrán en procesos como adhesión, coagulación, inflamación, defensa o crecimiento celular. Tras la activación plaquetaria las proteínas de membrana contenidas en los gránulos se expresan en la superficie plaquetar, mientras que las proteínas solubles se liberan al compartimento extracelular. La mayoría de las proteínas de membrana contenidas en los gránulos ya se encuentran presentes en la membrana plaquetaria en situación de reposo como las integrinas como  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , receptores de la familia de las inmunoglobulinas como GPVI, receptores de la fracción constante (FcR), moléculas de adhesión al endotelio plaquetar, el complejo GPIb/V/IX, tetraspaninas, CD36 o Glut-3[18]. Sin embargo, existen otras proteínas de membrana que se expresan exclusivamente en la superficie plaquetar cuando está activada como son fibrocistina L, CD109 y P-selectina, de ahí que esta última se use con frecuencia como marcador de activación plaquetaria en estudio por citometría de flujo.

- Gránulos densos: de menor tamaño que los gránulos  $\alpha$ , en número de tres a ocho por plaqueta. Habitualmente adoptan una estructura esférica, rodeada por un espacio vacío, que algunas veces es atravesado por filamentos. Derivan del

sistema endosomal y son organelas relacionadas con los lisosomas. En su formación juegan un papel importante BLOCs-1,-2 y-3, así como AP-3, por lo que mutaciones en este último receptor se asocian con deficiencia de estos gránulos como en el síndrome de Hermansky-Pudlack. Contienen sustancias como adenosin trifosfato (ATP), adenosin difosfato (ADP), nucleótidos de uracilo o guanina, serotonina, histamina, pirofosfato, calcio, potasio y magnesio. Además estos gránulos contienen proteínas de membrana como GPIb, integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , CD63 y las proteínas asociadas a la membrana liposomal (LAMP-2).

- Lisosomas: algo más pequeños que los gránulos  $\alpha$ , en número de 0 a 2 por plaqueta. Contienen enzimas encargadas de la degradación de proteínas como catepsinas D y E, la elastasa y la collagenasa, enzimas encargadas de la degradación de carbohidratos como glucisidasa o galactosidasa y otras sustancias como la fosfatasa ácida, trece hidrolasas ácidas, LAMP-1, LAMP-2 y CD63. Contribuyen a la fagocitosis y destrucción de partículas extrañas, aunque la función de estos lisosomas en la hemostasia aún no está clara.

Otros componentes de esta zona son los glicosomas (mitocondrias que aportan energía) que contienen glucógeno, y poseen una morfología oval y un tamaño similar a los gránulos  $\alpha$ .



**Figura 4. Receptores situados en la superficie de las plaquetas.**(Adaptado de Zapata, J.C., D. Cox, and M.S. Salvato, *The role of platelets in the pathogenesis of viral hemorrhagic fevers*. PLoS Negl Trop Dis, 2014. 8(6): p. e2858.)

### 1.2.3.3 Sistemas membranosos

Los sistemas membranosos más importantes son:

- Sistema canalicular abierto: forma parte de la superficie membranosa. Se trata de un sistema de canales interconectados que se extiende desde el interior al exterior de la plaqueta. Sus canales se emplean para el transporte de sustancias como el fibrinógeno desde el plasma a los gránulos  $\alpha$ , y para la liberación de sustancias desde los gránulos al exterior cuando tiene lugar la activación plaquetaria.
- Sistema tubular denso: residuo del retículo endoplásmico del megacariocito, que consiste en distintos canales distribuidos aleatoriamente por el citoplasma. Su

nombre se debe a su opacidad en el microscopio electrónico. Es el principal reservorio de calcio y de ácido araquidónico. Es el lugar de síntesis del tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), dado que es donde se encuentra la enzima ciclooxygenasa.

- Complejo de Golgi: pueden encontrarse residuos de complejos de Golgi megacariocíticos en < 1% de plaquetas, en algunos pacientes con desórdenes plaquetarios hipogranulares se encuentran más frecuentemente, indicando persistencia de granulopoyesis.
- Canales de retículo endoplásmico rugoso: solo se ven en pacientes con recambio plasmático alto debido a PTI.

#### **1.2.3.4 Estructuras inespecíficas**

Las plaquetas también contienen otras estructuras no específicas de las plaquetas, sino que se encuentran también en otras células. De este modo, pueden contener de 0-2 lisosomas.

### **1.3 Plaquetas: Funciones**

#### **1.3.1 Plaquetas en la hemostasia**

Una de las funciones principales de las plaquetas es preservar la integridad del endotelio vascular y controlar la hemorragia en caso de daño vascular. Participan tanto en la hemostasia primaria como en la secundaria.

Los mecanismos fundamentales implicados en este proceso incluyen: la adhesión, la agregación, la secreción y la coagulación.



Las plaquetas circulan en condiciones normales en el flujo sanguíneo en situación de reposo, estando su activación inhibida por el óxido nítrico (NO) y prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>). Cuando tiene lugar una lesión vascular, al dañarse el endotelio, quedan expuestas fibras de colágeno a las que se unen las plaquetas proporcionando una superficie de adhesión plaquetar y actuando como potente estímulo para su activación. Este proceso da lugar a la activación de diferentes vías de señalización que inducen al cambio conformacional de las plaquetas, que se extienden a lo largo de las fibras de colágeno y liberan TXA<sub>2</sub> y prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>). Estos últimos estimulan a las plaquetas cercanas que al activarse secretan más TXA<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>. En este proceso de adhesión interviene el complejo receptor GPIb/V/IX de la superficie plaquetar que interacciona con el FvW, así como los receptores GPVI y GPIa que se unen al colágeno en los lugares de lesión vascular. El papel del FvW en la adhesión de las plaquetas al subendotelio es fundamental, al unirse por un lado al fibrinógeno y por otro a dos receptores plaquetarios GP Ib/V/IX y a GP IIb/IIIa (integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3)[19].

Estas plaquetas activadas además se unen al fibrinógeno circulante mediante su receptor GP IIb/IIIa (también conocido como  $\alpha$ IIb $\beta$ 3), siendo el fibrinógeno fundamental en la unión de unas plaquetas a otras y por tanto en la agregación. Igualmente se ha identificado a la trombina como un componente fundamental en la agregación plaquetaria. Esta trombina se produce localmente en la superficie de las plaquetas activadas por FT, contribuye a la transformación de fibrinógeno en fibrina, y tiene por tanto un papel fundamental en la formación del tapón hemostático y estabilización del trombo formado.

***Funciones de las glucoproteínas de membrana******- Complejo GP Ib/V/IX***

Está involucrado no sólo en los procesos de hemostasia sino también en los de trombosis arterial.

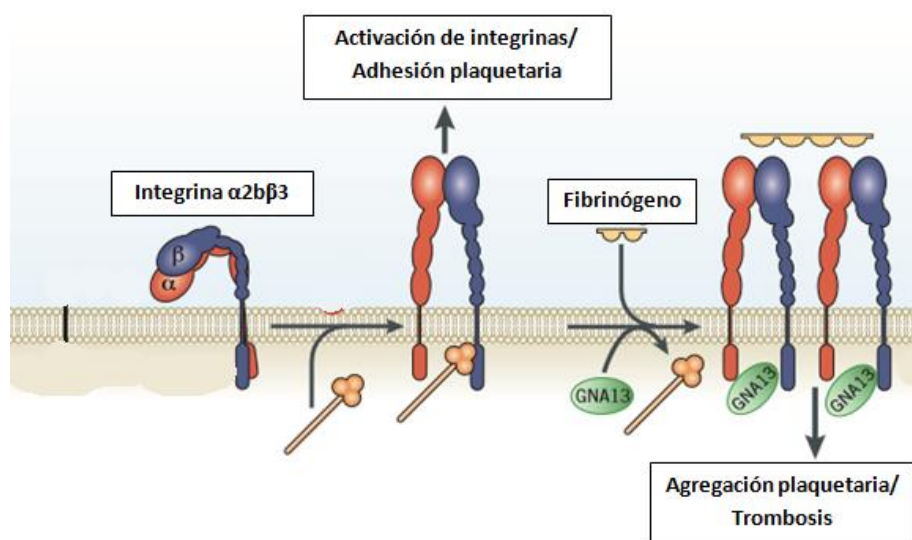
Su función primordial es la adhesión de plaquetas activadas a las células endoteliales y estructuras subendoteliales de la pared vascular lesionada, al unirse a FvW, y al fibrinógeno. Otro de sus ligandos es la trombospondina que contribuye a la adhesión plaquetar en situaciones de alto flujo en ausencia de FvW. La GPIb $\alpha$  es capaz de unir P-selectina aportando otro mecanismo de unión entre las plaquetas y el endotelio y entre las plaquetas entre sí. Además, este receptor provee sitios de unión para la trombina  $\alpha$ , factor XI y kininógeno de alto peso molecular, favoreciendo la actividad procoagulante. Por otro lado, la unión de GPIb $\alpha$  al factor XII compitiendo con el kininógeno inhibiendo la activación plaquetaria dependiente de trombina.

***- Glucoproteína VI***

Es el receptor para el colágeno. Las plaquetas se unen a las fibras de colágeno expuestas tras el daño vascular al unir el FvW al receptor GPIb/V/IX de la superficie plaquetar. Esto permite la unión de colágeno a la GPVI que da lugar a mecanismos de señalización intracelular que activan el mecanismo inside-out de las integrinas  $\alpha 2\beta 1$  y  $\alpha IIb\beta 3$ . Tras su activación este receptor es rápidamente removido de la superficie plaquetaria probablemente para evitar una activación excesiva mediada por colágeno de MKs y plaquetas en la MO tras daños menores en la vasculatura.

- ***Integrina  $\alpha\text{IIb}\beta 3$***

La activación plaquetaria inducida por agonistas estimula los procesos de señalización intracelular que convergen finalmente en la porción citoplasmática de la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ , se transmiten a través de la membrana plaquetar a través de señalizaciones vía inside-out resultando en la transformación del dominio extracelular de  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  en un receptor de alta afinidad para FvW y fibrinógeno. De este modo contribuye a las interacciones entre plaquetas, y, por tanto, a la formación de agregados plaquetarios. Al unir este receptor trombospondina 1, fibronectina y vitronectina contribuye también a la adhesión de la plaqueta a las estructuras endoteliales, regulando su agregación[6].



**Figura 5. Integrina  $\text{IIb}\beta 3$ .** Los procesos de señalización intracelular que convergen finalmente en la porción citoplasmática de la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ , se transmiten a través de la membrana plaquetar a través de señalizaciones vía inside-out, transformándose el dominio extracelular de  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  en un receptor de alta afinidad para FvW y fibrinógeno, contribuyendo a la agregación plaquetaria. (Adaptada de Boettner B. Riding the integrin wave in thrombosis. SciBX: Science - Business Exchange; London 6.45 (Nov 21, 2013): 1280.)

### ***Vías de activación plaquetaria***

#### **1. Mediada por trombina**

La trombina activa directamente a las plaquetas estimulando los receptores activados por proteasas (PAR) y la GP Ib/V/IX. Los PARs, que tienen un papel más importante en la respuesta plaquetar a trombina son el PAR 1 y el PAR 4. El PAR 2 no se expresa en las plaquetas y el PAR 3 actúa como cofactor en la activación del PAR 4.

La diferencia entre PAR 1 y PAR 4 es que el primero es sensible a niveles bajos de trombina, mientras que segundo requiere niveles más altos para estimular la activación y agregación plaquetar. Por otro lado, el PAR 1 da lugar a una rápida y transitoria elevación de los niveles intracelulares de calcio, mientras que PAR 4 da lugar a una respuesta más prolongada en el tiempo. Esto conlleva que tras exposición a grandes cantidades de trombina, PAR 1 se inactive rápidamente al ser su respuesta transitoria, mientras que PAR 4 mantiene la señalización más tiempo al tener un efecto más prolongado[20].

#### **2. Mediada por ADP**

El ADP es uno de los componentes más importantes liberados por las plaquetas activadas. Actúa como agonista de dos receptores purinérgicos expresados en las plaquetas P2Y1 y P2Y12. La activación de P2Y1 induce la agregación plaquetar mediada por ADP y es responsable del cambio conformacional de las plaquetas. Sin la activación de P2Y12 esta agregación sería transitoria. La activación de P2Y12 da lugar a una amplificación y estabilización de dicha agregación. Por tanto, la coactivación de ambos receptores es necesaria para una correcta agregación[6].

### **3. Mediada por colágeno**

Los receptores GPIb $\alpha$  y el GP IIb/IIIa de la superficie plaquetar interaccionan indirectamente con el colágeno a través del FvW. El receptor GP VI es el principal receptor de colágeno, que al unirse da lugar a la activación plaquetar necesaria para la adhesión, agregación, degranulación y actividad coagulante de la matriz proteica. Esta unión estimula las señales intracelulares que transforman las integrinas plaquetarias a un estado de alta afinidad, e induciendo la liberación de ADP y TXA<sub>2</sub>. GP Ia/IIa (integrina  $\alpha$ 2 $\beta$ 1) actúa cooperando con GP VI.

### **4. Mediada por tromboxano A<sub>2</sub>**

TXA<sub>2</sub> es liberado por las plaquetas adheridas, amplificando dicha adhesión al unirse a los receptores TP $\alpha$  y TP $\beta$ , esto lleva a cambios conformacionales en las plaquetas y estimulación del reclutamiento y agregación plaquetarios en el trombo primario.

### **5. Mediada por serotonina**

La serotonina es un vasoconstrictor que se une a los receptores 5HT-2A amplificando la respuesta plaquetaria, estimulando el cambio conformacional y contribuyendo al reclutamiento plaquetario en los lugares de lesión. Además, podría tener un efecto procoagulante al favorecer la retención de proteínas procoagulantes, trombospondina y fibrinógeno en la superficie plaquetaria.

### **Secreción del contenido de los gránulos plaquetarios**

Una vez que las plaquetas están activadas, los gránulos se concentran en el centro de la plaqueta durante los cambios conformacionales, pudiendo fusionarse entre ellos.

Posteriormente se fusionan con el sistema canalicular abierto, liberando su contenido en sus canales y finalmente al espacio extracelular. Otro mecanismo de liberación consistiría en la fusión directa de los gránulos a la membrana plasmática. Los receptores de proteínas de fijación soluble (SNAREs) de los gránulos plaquetarios asociados con la membrana plasmática y el sistema canalicular abierto, son los responsables de la fusión de los gránulos entre sí, al sistema canalicular abierto y a la membrana plasmática. La función de estos SNAREs en la secreción del contenido de los gránulos plaquetarios está regulada por proteínas chaperonas como la ATPasa NSF  $Mg^{2+}$  dependiente.

El citoesqueleto también juega un papel importante en la liberación del contenido granular. Aunque la polimerización de actina parece inhibir la liberación del contenido de los gránulos cuando la plaqueta está en reposo, facilita su secreción cuando está activa.

Al igual que en otras células, la liberación de calcio intracelular también estimula la liberación del contenido granular. Esta liberación también se ve estimulada por la actuación de las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de la protein-kinasa C.

La liberación de fibrinógeno y FvW de los gránulos  $\alpha$  estimulan la interacción de las plaquetas con el endotelio y de las plaquetas entre sí. El receptor del fibrinógeno  $\alpha IIb\beta 3$ , el receptor de colágeno GP VI y componentes del receptor complejo para FvW GP Ib/V/IX que se encuentran en los gránulos  $\alpha$  son expresados en la superficie plaquetar promoviendo la adhesión plaquetaria.

Al liberar factores de la coagulación (FV y FIX), los gránulos  $\alpha$  también participan en la hemostasia secundaria. Asimismo, también intervienen en procesos de limitación de la coagulación al liberar proteínas como antitrombina, proteína S e inhibidor de la vía de FT.

Los gránulos densos contribuyen a la trombosis y hemostasia como principal fuente de ADP, que actúa como agonista plaquetario en los lugares de lesión. La liberación de serotonina contribuye al proceso de agregación y participa en el tono vascular. El calcio y los polifosfatos liberados contribuyen a la formación del trombo.

### **1.3.2 Plaquetas en la inflamación**

En la circulación arterial debido el alto flujo sanguíneo lleva a una rápida eliminación de las moléculas del sitio de la lesión. Las plaquetas adheridas al endotelio ejercen un papel fundamental en el reclutamiento de células inmunitarias circulantes incluyéndolas en el trombo. Los gránulos  $\alpha$  contribuyen a la respuesta inflamatoria al expresar receptores de adhesión que facilitan la interacción con el endotelio y los leucocitos y secretando gran cantidad de quimiocinas. La P-selectina se translada a la superficie celular de los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas en el proceso de adhesión, reclutando monocitos, linfocitos y neutrófilos circulantes induciendo la respuesta inflamatoria en estas células. Las plaquetas también contienen abundantes quimiocinas y citoquinas como PF4, estas últimas han demostrado actuar contribuyendo a la activación y diferenciación de los monocitos, así como a la adhesión de neutrófilos al endotelio lesionado.

Las interacciones entre las plaquetas y células inmunitarias han demostrado jugar un papel fundamental en la fisiopatología y formación de la placa aterosclerótica. Sugiriendo que la modulación de la secreción plaquetaria podría contribuir a reducir la formación de dicha placa[21].

### **1.3.3 Plaquetas en la respuesta antimicrobiana**

Al producirse una lesión vascular puede ser una vía de entrada de patógenos bacterianos o virales al organismo. Las plaquetas son las primeras células en llegar al lugar de la lesión, por lo que está adquiriendo una gran importancia su papel para combatir a los patógenos. Se ha demostrado que muchas de las citoquinas secretadas por las plaquetas tienen propiedades antimicrobianas, y que las plaquetas tienen la capacidad de internalizar algunos de estos patógenos. Una vez internalizado no queda claro qué ocurre con ellos. Si bien las plaquetas no tienen estructuras para eliminar el patógeno, sí que liberan  $\beta$  defensinas con efecto antimicrobiano. Sin embargo, en otros trabajos se señala que la internalización de algunas bacterias podría llevar a estos patógenos a evitar la vigilancia inmunitaria[22].

Las plaquetas también pueden contribuir a la fagocitosis llevada a cabo por los leucocitos, al contribuir a la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) que aúnan inflamación y trombosis. Estos NETs favorecen el mantenimiento de la agregación plaquetaria y estimulan la agregación. Esta situación puede llevar a un círculo vicioso de producción de NETs y activación plaquetaria. Esta estrecha interacción entre plaquetas y neutrófilos es una condición necesaria para fagocitosis activa que se ve expandida en procesos inflamatorios en los que las plaquetas tienen un papel fundamental.

### **1.3.4 Plaquetas en los procesos neoplásicos**

Los gránulos  $\alpha$  contienen una gran cantidad de factores del crecimiento que son importantes no sólo en la reparación de las lesiones, sino también en procesos como la angiogénesis como son el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de



crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF  $\beta$ ). Estas moléculas pueden ser secuestradas por las células tumorales para potenciar la supervivencia de las células tumorales y metástasis.

A su vez las plaquetas contienen también factores anti-angiogénicos como PF 4, trombospondina 1 (TSP 1) o endostatina que pueden limitar la supervivencia y crecimiento tumoral.

Esto refleja nuevamente las múltiples facetas y el complejo papel que juega la secreción plaquetaria en los procesos patológicos. Se ha sugerido que la modulación de la secreción plaquetar podría ser una diana prometedora en el desarrollo de tratamientos anti-metastásicos[21].

#### **1.4 Apoptosis de las plaquetas**

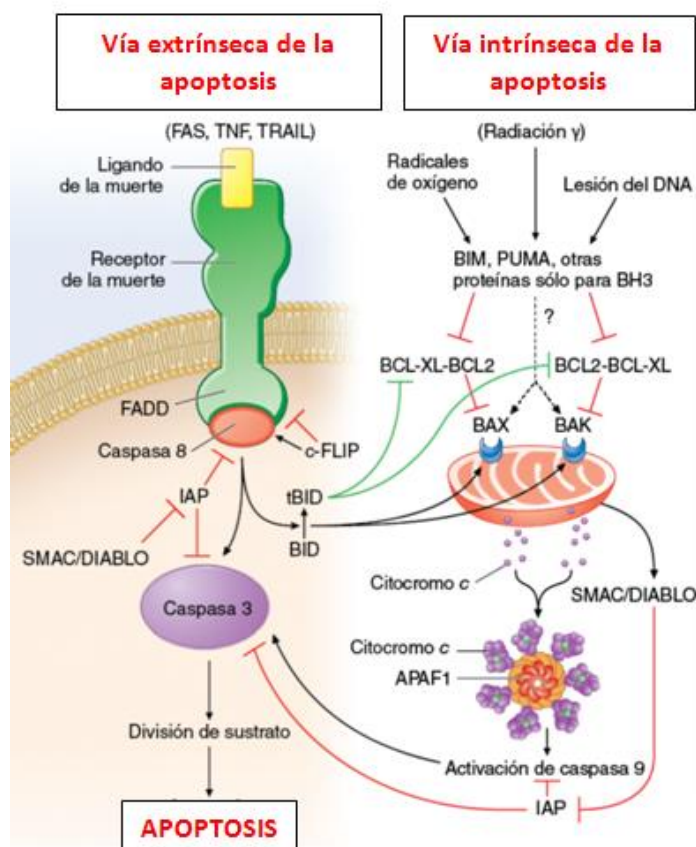
La apoptosis es un mecanismo fisiológico que regula la vida celular, es la forma fisiológica más común de muerte celular programada. Las plaquetas anucleadas, así como los megacariocitos poseen una maquinaria funcional apoptótica, y un programa intrínseco de apoptosis que regula su supervivencia dictando su vida útil.

Dos vías, una intrínseca y otra extrínseca son las encargadas de regular la apoptosis.

La vía intrínseca depende de las mitocondrias, está regulada por la familia de proteínas BCL-2 conteniendo proteínas pro-apoptóticas y pro-supervivencia. Los mediadores clave de la apoptosis intrínseca son Bak y Bax, que en caso de no ser inhibidas, oligomerizan en la membrana externa de la mitocondria, induciendo su permeabilización que conlleva la liberación de citocromo c y otras proteínas solubles y pro-apoptóticas al citosol. Una vez liberado, el citocromo c se une al factor activador pro-apoptótico (APAF1) y al

iniciador de la caspasa, procaspasa 9, para formar el apoptosoma, el cual activa la caspasa 9 y activa la cascada de las caspasas efectoras. Se han descrito diversos factores que pueden estimular esta vía intrínseca de la apoptosis plaquetar como estímulos químicos, fuerzas reológicas biomecánicas o la temperatura[23].

La vía extrínseca es estimulada por la unión de “*death receptors*”, que pertenecen fundamentalmente a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF), que contienen un dominio “*death*” intracelular capaz de reclutar y activar al iniciador caspasa, la procaspasa-8 activando la cascada de las caspasas efectoras.



**Figura 6. Vías de apoptosis celular.** Vía intrínseca de la apoptosis, regulada por las mitocondrias, y vía extrínseca regulada por la unión de los “*death receptors*”, tras una serie de reacciones ambas desembocan en la cascada de las caspasas (Tomada de Longo DL, Kasper DL, Jameson J, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J. Harrison. Principios de Medicina Interna)

Esta unión en ambas vías de ligandos y receptores inicia la apoptosis al producir la activación de las caspasas. Estas últimas, activarán tanto a las endonucleasas citoplasmáticas que degradan el material celular, como a las proteasas que digieren las proteínas nucleares y el citoesqueleto.

Numerosos estudios han tratado de dilucidar el papel de la PS en la apoptosis y activación plaquetar. La externalización de la PS en la superficie de las plaquetas es un indicador o señal que lleva al reconocimiento de estas plaquetas como “no deseadas” para ser fagocitadas y eliminadas. Sin embargo, la exposición de PS en la superficie plaquetar también ocurre en la activación plaquetaria interviniendo en su función procoagulante, y contribuyendo a la propagación del proceso de coagulación facilitando el ensamblaje de los factores de coagulación y activando los complejos tenasa y protrombinasa[24]. Dos vías diferentes parecen regular la exposición de PS, por un lado una calcio-dependiente y caspasa-independiente, y otra mediada por la vía Bak/Bax.

Se han descrito niveles anormalmente elevados de PS en la superficie de las plaquetas en pacientes adultos diagnosticados de PTI crónica y pediátricos diagnosticados de PTI de reciente diagnóstico, en estos últimos Winkler detectó además una alta proporción de plaquetas que contenían caspasas 3, 9 y 8 activadas[25].

En otro estudio donde se compararon pacientes diagnosticados de PTI con controles sanos, se encontraron niveles de PS significativamente más elevados en pacientes con PTI que en los controles, sin embargo, en este caso la exposición de PS parecía ser caspasa independiente, sin encontrar signos de activación plaquetar, lo que hace suponer que puedan existir otros mecanismos para externalización de PS en la PTI[26].

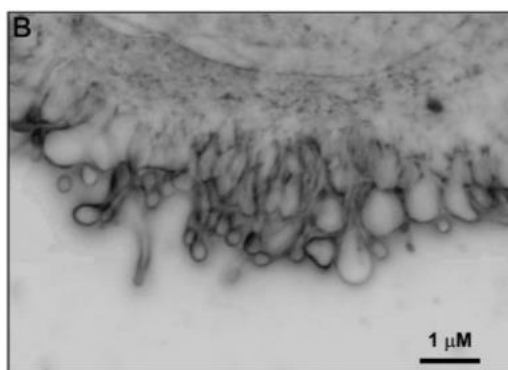
Se ha sugerido que la externalización aumentada de PS en la superficie plaquetar en pacientes con PTI pueda conllevar una excesiva eliminación de las plaquetas por el retículo-endotelial y por tanto causar o agravar la trombocitopenia.

### 1.5 Micropartículas

Las micropartículas (MPs) fueron descritas por primer vez por Wolf, que las describió como material subcelular procoagulante presente en plasma y suero, rico en fosfolípidos (PLs) y que se originaba a partir de las plaquetas, denominándolo “*platelet dust*”[27]. son vesículas fosfolipídicas de 0.1-1  $\mu\text{m}$  de diámetro que son liberadas por distintas células sanguíneas o vasculares tras ser sometidas a distintos tipos de estimulación o estrés, la activación y apoptosis. Circulan en sangre en una concentración aproximada de 5-50  $\mu\text{g/mL}$ . Proceden de células endoteliales, eritrocitos, leucocitos, MKs o plaquetas. Están compuestas por una membrana con una capa externa de fosfatidilcolina y esfingomielina, mientras que la capa interna contiene PS y fosfatidil-etanolamina, esta estructura le confiere estabilidad, en su interior contienen proteínas correspondientes a su estirpe celular y microRNAs [28]. Expresan marcadores de membrana característicos de las células que las originan.

La generación de estas MPs resulta de un cambio en la asimetría de la bicapa lipídica de la membrana de las células que las originan. En las plaquetas PLs neutros como fosfatidilcolina y esfingomielina están expuestos en la membrana externa en situación de reposo, la generación de micropartículas derivadas de plaquetas (MPPs) lleva a la superficie PLs aniónicos como PS y fosfatidil-etanolamina, que inicialmente estaban en la capa interna de la membrana. Estos cambios estructurales están bajo el control de tres sistemas enzimáticos: el de la flipasa, la flopasa y la escramblasa. En situación de

reposo sólo se encuentra activa la flipasa, contribuyendo a internalizar los PLs cargados negativamente, manteniendo la asimetría de la bicapa lipídica. Cuando se produce la activación de la célula o durante los procesos de apoptosis, aumenta la concentración intracelular de calcio, inactivándose la flipasa y activándose la flopasa y la escramblasa, lo que lleva a una traslocación de la fosfatidilserina y otros PLs resultando en una pérdida de la asimetría de la membrana, y el progresivo desarrollo de sitios procoagulantes para formación de complejos terciarios/cuaternarios como parte fundamental de su función hemostática. A su vez, el aumento intracelular de calcio activa proteasas que anclan el citoesqueleto haciendo la membrana menos rígida.



**Figura 7. “Blebbing” en la membrana del megacariocito.** Burbujas en la superficie de MK de ratón in vivo (Tomado de Flaumenhaft, R., et al., *Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles*. Blood, 2009. 113(5): p. 1112-21)

Estas MPs contienen subgránulos en los que se almacena P-selectina, fibrinógeno, factor plaquetario 4 o VEGF aunque cada MP almacenará solo proteínas específicas.

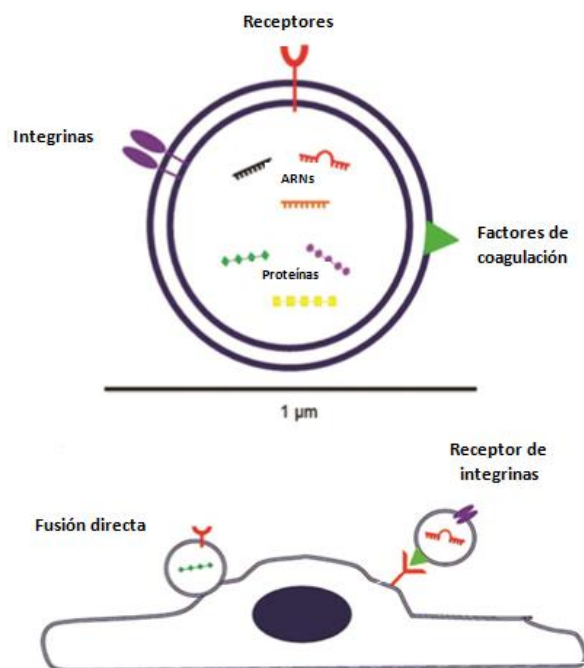
Poseen una capacidad procoagulante probablemente debida a la exposición de PS y FT y a la fusión de las MPs con las plaquetas activadas, proceso que requiere de la

interacción del Ligando Glicoproteico 1 de la P-selectina (PSGL-1) de las MPs con la P-selectina plaquetaria.

Circulan en sangre en condiciones fisiológicas, pero sus niveles se elevan en circunstancias patológicas como patología vascular, infecciosa o de origen inmune[29-31].

En un estado fisiológico la mayor parte de las MPs circulantes son de origen plaquetario o megacariocítico[32, 33]. Las MPPs representan del 70-90% de las MPs circulantes en sangre con un rango de entre 100-1000/ $\mu$ L[34]. El número de MPPs aumenta al activarse la cascada de la coagulación o el sistema del complemento o ante la influencia de signos de apoptosis. Dado que al tener su origen en las plaquetas pueden expresar receptores de membrana plaquetares y su composición es fundamentalmente fosfolipídica, se ha sugerido que pueden tener un papel importante en las comunicaciones plaqueta-célula y célula-célula, al contener moléculas bioactivas (lípidos, factores de crecimiento, microRNAs o mitocondrias) capaces de transmitir mensajes a células vecinas o células diana[35, 36].

Las MPs tienen un efecto importante en la polimerización de fibrina y en las propiedades y estructura final del coágulo de fibrina. Intervienen por un lado, en la formación de entramados de fibrina densos resistentes a la lisis enzimática, y por otro lado, al interactuar directamente con la fibrina producen trombina. De este modo podemos decir que las MPs actúan como moduladores de la formación de fibrina [37].



**Figura 8. Contenido y diana de las micropartículas.** Figura superior-Las MPs contienen componentes membranosos e intracelulares secuestrados de las células que las generan. Componentes intracelulares como factores de transcripción, microRNAs y proteínas. Componentes de membrana como ácidos grasos, receptores o membranas integrales. Figura inferior- Se han sugerido dos mecanismos diana por los que las MPs alcanzan sus células efectoras diana. El primero tiene lugar por fusión directa de la membrana o endocitosis, en la que los componentes de las MPs se liberan al citoplasma de la célula receptora. El segundo implica una interacción de la MP con el receptor de membrana o integrina para estimular la señalización celular. (Adaptada de Hargett, L.A. and N.N. Bauer, *On the origin of microparticles: From "platelet dust" to mediators of intercellular communication*. Pulm Circ, 2013. 3(2): p. 329-40.)

Estas MPs se han involucrado en la etiopatogenia de diferentes patologías:

- Tienen un papel importante en la aterosclerosis al adherirse por un lado al subendotelio y a las células endoteliales activadas a través de la GPIIb/IIIa y al estimular por otro lado, la unión de los leucocitos a las células endoteliales y la adhesión leucocito-leucocito.
- Se ha demostrado que niveles elevados de MPs favorecen la formación del trombo en los procesos aterotrombóticos, por este motivo se podrían emplear como indicador clínico de lesiones aterotrombóticas y como marcador pronóstico. Por

ejemplo, se ha descrito que las MPs circulantes reflejan la gravedad del daño endotelial y la activación plaquetaria durante la isquemia miocárdica.

- En procesos neoplásicos tienen también un papel importante. Estudios *in vitro* han demostrado que pueden inducir angiogénesis y favorecer la formación de metástasis. Además, la elevación de sus niveles se ha correlacionado con tumores agresivos, mal pronóstico y génesis tumoral. Por todo lo anterior, se ha sugerido que la cuantificación de MPs se podría utilizar para predecir estado de hipercoagulabilidad en estos pacientes, su riesgo de metástasis, así como la eficacia del tratamiento [38] .
- En la PTI se ha demostrado que el mayor riesgo trombótico que presentan los pacientes parece estar asociado a niveles más elevados de MPPs. Asimismo, se ha determinado que niveles elevados de MPPs pueden tener un cierto efecto protector frente a sangrados graves en pacientes pediátricos.
- Se han observado también niveles elevados de MPPs en pacientes con otras patologías autoinmunes como artritis reumatoide, asma e infecciones como malaria o dengue[39].
- La generación de MPs también puede verse exacerbada *in vitro*, durante el procesamiento y almacenamiento de los componentes sanguíneos, algo que puede conllevar efectos adversos transfusionales. Su papel está cobrando importancia en este campo, como parámetro de seguridad y debe ser contemplado en los programas de hemovigilancia[40].
- Se está investigando el papel que pueden tener las MPPs en el desarrollo, angiogénesis, reparación de heridas y remodelación tisular actuando posiblemente como estructuras “*liposoma-like*” que podrían emplearse como transportadoras de



factores de crecimiento a células y tejidos dañados, cumpliendo un papel en la medicina regenerativa[41].

### **1.3 Papel de las plaquetas en la Hemostasia**

Las plaquetas tienen un papel importante en la hemostasia, tanto en la hemostasia primaria, como en la secundaria.

En condiciones fisiológicas las plaquetas circulan en la periferia de los vasos, sin interaccionar entre ellas ni con la superficie del endotelio. Cuando se produce un daño endotelial, queda expuesto el colágeno subendotelial, las plaquetas se unen a él a través del receptor GPVI y al FvW a través de la GPIb/V/IX. Estas interacciones desencadenan el proceso de activación plaquetaria dando lugar al cambio conformacional de la plaqueta, iniciándose la secreción de mediadores como el ADP, la adrenalina, la serotonina y el TXA<sub>2</sub>, que contribuyen a la vasoconstricción y a la activación y el reclutamiento de nuevas plaquetas hacia el lugar de la lesión. Estos cambios favorecen un estado de mayor afinidad de las integrinas plaquetarias  $\alpha 2\beta 1$  (receptor de colágeno),  $\alpha 5\beta 1$  (receptor de fibronectina),  $\alpha 6\beta 1$  (receptor de laminina) y  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  (receptor de fibrinógeno, que también une FvW y fibronectina) permitiendo la adhesión firme de la plaqueta a la matriz subendotelial, así como la agregación plaquetaria.

La hemostasia secundaria se inicia a través de un proceso de reacciones proteolíticas, que se activan consecutivamente dando lugar a proteínas con actividad enzimática. La cascada de la coagulación permite la generación de trombina que transforma el fibrinógeno en fibrina permitiendo finalmente la formación de un coágulo estable.

Son esenciales en este proceso los factores de la coagulación, proteínas que se encuentran en la sangre como zimógenos inactivos y que pueden ser activados en enzimas con actividad serín-proteasa mediante proteólisis.

En una fase inicial de la coagulación o **fase de inicio**, el FT expuesto en la superficie de las células se une al factor VII activado (FVIIa) que en condiciones fisiológicas se encuentra en concentraciones muy bajas en el torrente sanguíneo. Este complejo FT/FVIIa activa los factores IX y X. El FX activado (FXa) activa pequeñas cantidades del FV, que junto al FVa liberado por las plaquetas activadas permitirá la formación del complejo protrombinasa (FXa-FVa). Este complejo actuará sobre la protrombina (FII) para generar pequeñas cantidades de trombina (FIIa).

Durante este proceso, las moléculas de FXa que abandonen la superficie celular en la que se han formado, son inactivadas rápidamente por el inhibidor de la vía del FT (TFPI, del inglés *“Tissue Factor Pathway Inhibitor”*) o por la antitrombina (AT).

Posteriormente se inicia la **fase de amplificación**, en esta fase la superficie celular implicada es la membrana plaquetaria. Esas pequeñas cantidades de trombina generadas en la fase de inicio son capaces de activar los cofactores de coagulación FV, FVIII, FXI, así como las plaquetas, las cuales cambian su configuración y estructura. Este cambio conformacional de la plaqueta produce la exposición de PLs cargados negativamente como la PS en su membrana los que servirán de anclaje a los diferentes factores de la coagulación.

En la **fase de propagación**, que tiene lugar también en la superficie de las plaquetas, se establece un sistema de retroalimentación positivo, que conduce a la obtención de

grandes cantidades de trombina. Se generan grandes cantidades de FXa que convierten la protrombina en trombina y el fibrinógeno en fibrina. Es en esta fase donde se producen grandes cantidades de trombina y de fibrina.

#### **1.4 Trombocitopenia**

En circunstancias fisiológicas la cifra de plaquetas circulantes en el torrente sanguíneo es de  $150-450 \times 10^9/L$  plaquetas, cuando la cifra es menor se considera que existe trombocitopenia, suele considerarse leve y sin relevancia clínica cuando oscila entre  $100-150 \times 10^9/L$ , por debajo de esa cifra puede tener trascendencia clínica y se debe estudiar con el fin de determinar su origen.

Las trombocitopenias pueden ser hereditarias o adquiridas.

Las hereditarias constituyen un grupo heterogéneo, en los que diferentes mutaciones genéticas condicionan una disminución de los megacariocitos, o una trombopoyesis ineficaz, o alteraciones estructurales de las plaquetas. En este grupo se englobarían entidades como la trombocitopenia amegacariocítica congénita, trombocitopenia amegacariocítica con sinostosis radioulnar, trombocitopenia con ausencia de radio, síndrome de Wiskot Aldrich, síndrome de May-Hegglin, síndrome de Fechner, síndrome de Bernard-Soulier, síndrome de Sebastian y Epstein, así como el síndrome de DiGeorge, anomalías secundarias como la enfermedad de von Willebrand tipo 2B o la tesarismosis. Las trombocitopenias adquiridas, mucho más frecuentes, pueden tener un origen central, periférico o una combinación de ambos. En este trabajo nos centraremos en las trombocitopenias adquiridas, y más concretamente en la PTI.

<b>Causas de trombopenia adquirida de origen periférico</b>		
Origen inmune	<b>Autoinmunes</b>	<p>Trombopenia inmune primaria</p> <p>Trombopenia inmune asociada (infección VIH, VHC, enfermedades autoinmunes, síndromes linfoproliferativos crónicos)</p> <p>Trombopenia inducida por fármacos (heparina, sulfonamidas, tiazidas, fenitoína, sales de oro, antagonistas de la glucoproteína IIb/IIIa)</p>
	<b>Aloinmunes</b>	<p>Trombopenia neonatal aloinmune</p> <p>Trombopenia postransfusional</p> <p>Refractariedad a la transfusión de plaquetas</p>
	<b>Otras inmunes</b>	<p>Pseudotrombopenia inmune</p> <p>Trombopenia cíclica periférica</p> <p>Síndrome antifosfolípido</p> <p>Enfermedad Injerto contra Huésped</p> <p>Enfermedad venoclusiva hepática</p>
Origen no inmune	<b>Hiperconsumo</b>	<p>Coagulación intravascular diseminada</p> <p>Microangiopatía trombótica</p>
	<b>Por destrucción</b>	Circuitos extracorpóreos, infecciones
	<b>Por pérdida al exterior</b>	Hemorragias, hemodiálisis
	<b>Por distribución anormal</b>	Hiperesplenismo, hipotermia

**Tabla 1. Causas de trombocitopenia adquirida de origen periférico.** Adaptada de Manual Práctico de Hematología Clínica 2015. 5ª Ed.

#### 1.4.1 Trombocitopenia de origen periférico. Trombocitopenia inmune (PTI)

La trombocitopenia inmune (PTI) es una patología de origen inmune caracterizada por una trombocitopenia aislada (cifra de plaquetas  $< 100 \times 10^9/L$ ). En adultos la PTI

primaria supone aproximadamente el 80% de los casos, mientras que el 20% restante es secundario a otras patologías. La prevalencia de la PTI es de 9.5 casos/100.000 adultos, con una incidencia de unos 3.3/100.000 adultos/año, aumentando con la edad[42]. No hay diferencias entre ambos sexos, excepto en edades comprendidas entre 30 y 60 años, donde es más prevalente en mujeres[43].

Tradicionalmente se asumió que el mecanismo etiopatogénico responsable de la PTI era la destrucción periférica de las plaquetas mediada por autoanticuerpos, pero el hecho de que hasta en un 30% a 40% de pacientes no pudiera demostrarse la presencia de éstos llevó a pensar que existirían otros mecanismos implicados en la patogenia de la enfermedad, como la disregulación de la megacariopoyesis o del sistema inmune.

El diagnóstico de la PTI es un diagnóstico de exclusión, descartando otras causas (infecciosas, centrales, inmunes, hematológicas...) que puedan justificar la trombocitopenia.

La PTI se clasifica en función de la duración en de nuevo diagnóstico, persistente o crónica[44].

En adultos suele ser de comienzo insidioso, sin haber presentado un cuadro infeccioso o viral previo y suele tener un curso crónico[45]. En niños suele ser de corta duración con remisiones espontáneas en los seis primeros meses hasta en dos tercios de los casos[46].

La mayoría de los pacientes cursan sin sintomatología o clínica hemorrágica mucocutánea leve, aunque en algunos casos pueden presentar hemorragia gastrointestinal, clínica mucocutánea extensa o hemorragia intracraneal[47].

La decisión de iniciar tratamiento en los pacientes con PTI debe basarse no sólo en la cifra de plaquetas, sino también en la presencia o no de clínica hemorrágica.

Con el fin de estandarizar criterios se han elaborado guías que tratan de orientar en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la PTI tanto a nivel nacional, documento de consenso elaborado por la sociedad española de hematología y hemoterapia, como internacional: el consenso internacional del International Working Group (IWG), la guía de la sociedad americana de hematología o la del grupo alemán entre otras.

#### **1.4.1.1 Etiopatogenia**

La etiopatogenia de la PTI ha sido objeto de múltiples investigaciones en los últimos años. El mecanismo patogénico fundamental es la destrucción de las plaquetas por autoanticuerpos, aunque se ha observado en estos pacientes una compleja disregulación del sistema inmune.

##### Autoanticuerpos y células B

Los pacientes con PTI producen autoanticuerpos anti-plaquetas de tipo Ig G (más raramente de tipo Ig A o Ig M) que se unen a los receptores plaquetarios, fundamentalmente a la GP  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (GPIIb/IIIa) y a la GP Ib/V/IX, para posteriormente ser fagocitadas a nivel esplénico y hepático. Sin embargo, hasta en un 30-40% de los pacientes con PTI no se detectan estos anticuerpos, lo que hace suponer una importante participación de mecanismos mediados por células T. En los pacientes en que se detectan estos autoanticuerpos antiplaquetarios se han detectado anticuerpos dirigidos contra otras proteínas diferentes de las GPs de superficie, incluyendo proteínas citosólicas, lo que lleva a pensar que las plaquetas puedan ser sometidas a degradación proteica por las células presentadoras de antígeno (CPA), siendo posteriormente estos

antígenos presentados a las células T. Se han sugerido otros mecanismos adicionales que estarían implicados en la producción de anticuerpos como mutaciones somáticas, defectos en la eliminación de clonas de células B autorreactivas o reactividad cruzada antigénica (denominado en inglés “molecular mimicry”) que puede ocurrir en procesos infecciosos donde el antígeno viral es reconocido como similar al antígeno plaquetar dando lugar a autoanticuerpos anti-plaquetas en un fenómeno de reacción cruzada[48-50]. El estrés oxidativo podría favorecer esta producción de autoanticuerpos. Se ha sugerido que dependiendo del tipo de epítipo afectado, varía la gravedad de la trombopenia, habiendo algunos que inducen un mayor aclaramiento y apoptosis plaquetar, mientras que otros afectan más a la megacariopoyesis.

Asimismo, se ha demostrado que existe una relación directa entre la destrucción plaquetaria mediada por autoanticuerpos y los niveles de la proteína C reactiva (PCR). Los niños que presentan niveles de PCR elevados al diagnóstico tienen una recuperación más lenta de la cifra de plaquetas. Y del mismo modo, cuando estos niños recuperan su cifra de plaquetas tras el tratamiento con IGIV, descienden los niveles séricos de PCR. Por lo tanto, parece que la PCR favorece la destrucción plaquetar mediada por anticuerpos y esto podría explicar el empeoramiento de la trombocipenia en episodios infecciosos[51].

La presencia de estos autoanticuerpos se ha asociado a un mayor riesgo protrombótico, probablemente debido a las MPs liberadas por las plaquetas activadas u otros factores predisponentes.

Los anticuerpos son secretados por las células plasmáticas, que están aumentadas en los pacientes con PTI, así como el regulador de células B y el factor activador de células B (BAFF), este último juega un papel fundamental en la selección de células B,

promoviendo su supervivencia y proliferación. En pacientes con PTI se ha observado un aumento de actividad de BAFF, así como polimorfismos en su región promotora. El ligando inductor de la proliferación del linfocito B (APRIL) también se han implicado en la etiopatogenia de la PTI. Ambas citoquinas pertenecen a la superfamilia del factor de necrosis tumoral y son producidas por células del sistema inmune como polimorfonucleares, células dendríticas, macrófagos, células estromales, linfocitos T activados y linfocitos B aberrantes.

El BAFF se une a tres receptores diferentes que se encuentran en la superficie de los linfocitos B al BAFF-R (receptor para el BAFF), al antígeno de maduración de células B (BCMA) y al TACI (activador transmembrana modulador de calcio e interactor de ligando de ciclofilina); por su parte el APRIL se une al BCMA, al TACI y al HSPG.

Las células B también están aumentadas en la pulpa roja del bazo de pacientes con PTI, con un aumento en su tasa de proliferación. Existe una alteración en las células B reguladoras (Bregs) responsables de la inmunotolerancia[52, 53], estas células están disminuídas en la circulación debido a su secuestro en compartimentos linfoides, sobre todo en el bazo.

### Células T

La función de las células T helper foliculares (Thfs) es contribuir a la formación de centros germinales y generación de células de memoria, contribuyendo a la regulación de la respuesta inmune humoral que tiene lugar en procesos infecciosos, enfermedades autoinmunes o procesos tumorales. En los pacientes con PTI existe un aumento de la reactividad de células T helper frente a plaquetas y una menor frecuencia de células T



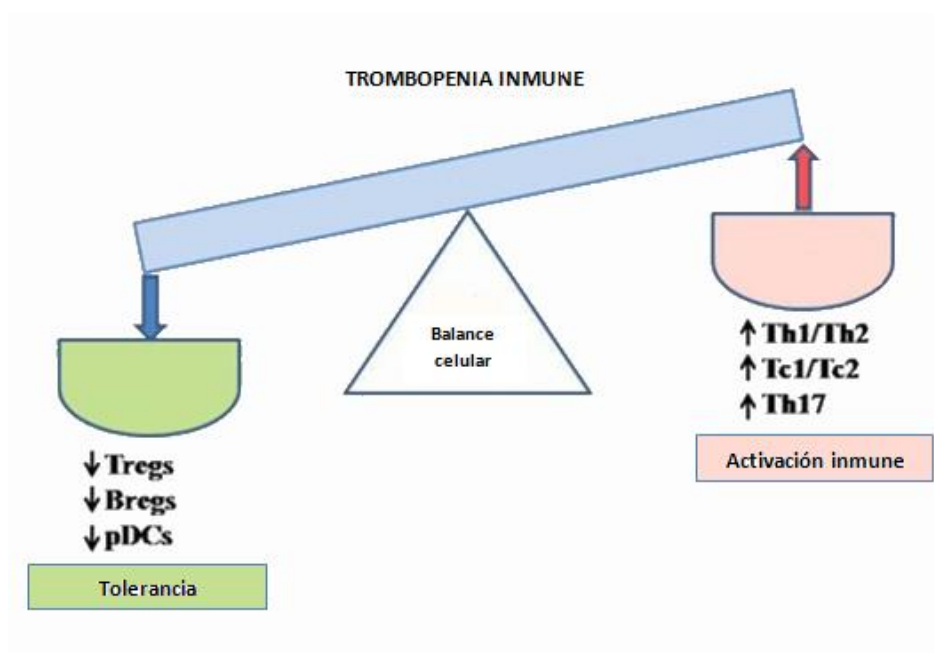
reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> y patrones de activación CD4<sup>+</sup> Th0 y Th1. En estos pacientes se detectan células T CD8<sup>+</sup> circulantes, capaces de lisar plaquetas directamente in vitro, y que se acumulan en la médula ósea donde inhiben la trombopoyesis[54]. Además las células T CD3<sup>+</sup> de los pacientes con PTI tienen una menor tasa de apoptosis y una mayor tasa de expansión clonal, lo cual se traduce en una secreción anormal de citoquinas incluyendo IL-2, INF $\gamma$  e IL-10, que podrían ser responsable de la menor secreción de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> y la disminución de la función en pacientes con enfermedad activa[55-59].

Los linfocitos T reguladores (Tregs) cumplen un papel fundamental en el mantenimiento de la inmunotolerancia a través de su interacción con las CPA y al reducir las respuestas de las células B CD19<sup>+</sup> y células T CD8<sup>+</sup>. Estos Tregs podrían ser los responsables de que se desencadene la PTI, probablemente los niveles bajos circulantes se deban a un secuestro de éstos. Una mala comunicación entre estos Tregs y las células dendríticas (CDs) conlleva unas células dendríticas menos tolerogénicas[60]. Los monocitos CD16<sup>+</sup> que se encuentran aumentados en la PTI contribuyen a la modulación de los Tregs, ya que liberan IL-12, responsable de la transformación de células T en células Th1 e inhibiendo la secreción de Th17, inhibiendo en último término a los Tregs. Además estos monocitos CD16<sup>+</sup> contribuyen a través de la vía de IFN $\gamma$  a la proliferación de células T CD4<sup>+</sup>[61]. En los pacientes con PTI existe un defecto en las células Th con un desbalance importante en la secreción de citoquinas, todo ello puede conllevar una activación de las células B. Numerosos autores indican que las células Th17 y las citoquinas asociadas a ellas IL-6 y TGF $\beta$  se encuentran estimuladas en los pacientes con PTI, lo que junto a la alteración en las células Tregs promueve una respuesta inmune mediada por Th1

estimulando el proceso patológico. Se ha determinado que este desbalance entre Treg/Th17 se asocia a la actividad de la enfermedad en adultos con PTI[62].

La IL-10 secretada entre otras células por los Tregs es una citoquina con propiedades anti-inflamatorias, contribuyendo al control de algunos procesos autoinmunes. En la PTI existe una deficiencia en la cantidad y función de los Tregs asociada a una activación de las células T efectoras, lo que sugiere que debido a la insuficiente cantidad de IL-10 secretada podría verse comprometida la capacidad inhibitoria de los Tregs frente a las células T efectoras, contribuyendo a la exacerbación de la respuesta inmune mediada por células T CD4<sup>+</sup>[63].

Wang y cols. detectaron una elevación los niveles de IL-17 en pacientes pediátricos con PTI, que se correlacionaban con niveles elevados de IFN $\gamma$ , sugiriendo que tanto Th17 como Th1 estarán involucrados simultáneamente en la disregulación del sistema inmune observada en pacientes pediátricos[64], sin embargo estos hallazgos no se han encontrado en población adulta, lo que hace pensar que IL-17 no cumple un papel importante en la patogenia de pacientes adultos con PTI[65, 66]. IL-23 es secretada por las CPA es el mediador fundamental en la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> inmaduras en células Th 17. Recientemente está en estudio la importancia del eje IL23/Th17 en pacientes con PTI, encontrando que IL-17 e IL-23 se encuentran elevados en estos pacientes, disminuyendo sus niveles tras instauración de tratamiento efectivo, sugiriendo que IL-23 estaría involucrada en el desarrollo de la PTI a través de la estimulación de la respuesta Th17[67].



**Figura 9. Esquema del desbalance inmune en PTI.** En el desarrollo de la PTI juegan un papel fundamental la disregulación de la actividad de las células T y la alteración de las citoquinas. El desbalance en el ratio entre las células Th1 /Th2 lleva a una diferenciación autorreactiva de las células B. Una disminución en el número o una alteración en la función de los Tregs, Bregs y CD tolerogénicas puede contribuir a estimular la activación inmune. (Imagen adaptada de Consolini, R., A. Legitimo, and M.C. Caparello, *The Centenary of Immune Thrombocytopenia - Part 1: Revising Nomenclature and Pathogenesis*. Front Pediatr, 2016. 4: p. 102.)

### Células dendríticas

Las CPA incluyendo las CDs, macrófagos y las células B en determinadas condiciones son las células encargadas de detectar la presencia de antígenos externos en el medio con el fin de procesarlas y presentarlas a las células del sistema inmune. En determinadas circunstancias como la inflamación estas células pueden ver alterada su función y detectar antígenos propios como extraños contribuyendo al desarrollo de enfermedades autoinmunes. Las CDs son las más eficientes CPA, y se ha demostrado que tanto ellas como las CDs plasmocitoides pueden encontrarse alteradas en pacientes con PTI [26]. Las CDs plasmocitoides se encuentran disminuídas en pacientes con PTI primaria y PTI secundaria a H. Pylori, observando que la cifra de plaquetas se encuentra

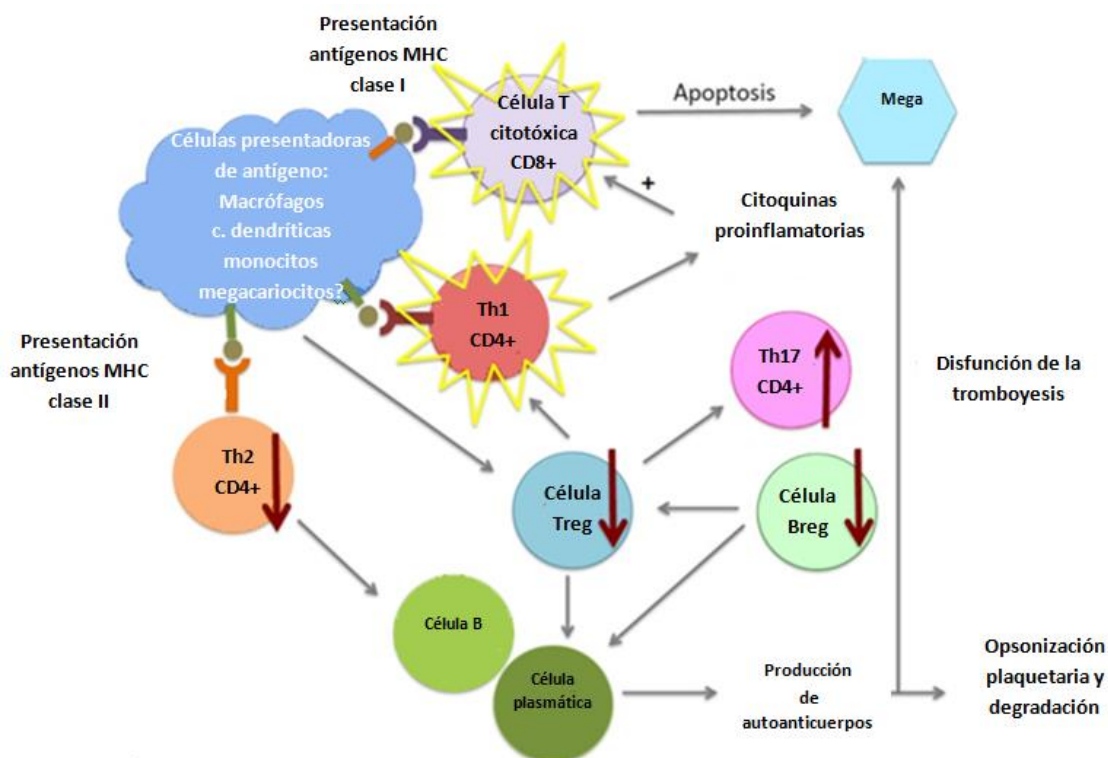
estrechamente relacionada con la cifra de CDs plasmocitoides en estos pacientes apoyando el papel fundamental de éstos en esta patología[68].

Por tanto, la función de las CPA, especialmente de las CDs está alterada en pacientes con PTI contribuyendo a la activación linfocitaria.

### Megacariocitos

Aproximadamente un tercio de los pacientes diagnosticados de PTI presentan autoanticuerpos capaces de inhibir la maduración de los MKs.

Los niveles de TPO se encuentran habitualmente en rangos de normalidad en los pacientes diagnosticados de PTI a diferencia de lo que ocurre en otras trombocitopenias de otro origen. Sin embargo, los niveles de citoquinas reguladoras de la megacariopoyesis como IL-6 e IL-11 están aumentados. En la PTI los anticuerpos que se unen a GPIb y GPIIb/IIIa inducen cambios morfológicos y fisiológicos en los MKs, así como las células mesenquimales pluripotenciales encargadas de mantener la proliferación de MKs y formación de proplaquetas, que se encuentran afectadas y parecen proapoptóticas. Estas células mesenquimales pluripotenciales parecen no multiplicarse en pacientes con PTI perdiendo su actividad para controlar la proliferación de células T CD8. Parece que en la PTI se encuentran afectados tanto los MKs como el nicho en la médula ósea, debido a los autoanticuerpos y células T que conllevan una disregulación en la maduración de los MKs y en la producción de plaquetas a pesar de unos niveles de TPO dentro del rango de la normalidad.



**Figura 10. Patogenia de la PTI.** En la patogenia de la PTI están involucradas las células B y células plasmáticas, cuya regulación está alterada, produciendo autoanticuerpos, que se unen a plaquetas y MKs, induciendo su alteración y destrucción hepática y esplénica. La respuesta inmune celular también está alterada, llevando a un descenso en los Tregs y Bregs, que contribuye a la supervivencia de las células plasmáticas autorreactivas (contribuyendo a la producción de autoanticuerpos) y desbalance del subgrupo de células Th CD4<sup>+</sup>. Asimismo, se activan las células T CD8<sup>+</sup> llevando a la apoptosis de plaquetas y MKs. Imagen (Adaptada de Zufferey, A., R. Kapur, and J.W. Semple, *Pathogenesis and Therapeutic Mechanisms in Immune Thrombocytopenia (ITP)*. J Clin Med, 2017. 6(2).)

#### 1.4.1.2 Terminología y definiciones

Clásicamente a la PTI se la conocía como púrpura trombopénica idiopática, hasta que en 2009, en una reunión del International Working Group (IWG) propusieron modificar el término a trombopenia inmune, con el fin de destacar el origen inmune de la patología, manteniendo las siglas previas de PTI, donde la P hoy hace referencia a primaria. En esta reunión de expertos se estableció  $<100 \times 10^9/L$  como cifra límite de plaquetas para el diagnóstico de la enfermedad. Con el fin de unificar criterios quedaron en esta reunión establecidas las definiciones de PTI en función de su origen:

**PTI primaria:** Enfermedad autoinmune que se caracteriza por trombocitopenia aislada (recuento  $<100 \times 10^9/L$ ) sin que pueda ser identificada ninguna causa ni patología que la justifique. El diagnóstico es de exclusión y puede cursar con clínica hemorrágica, aunque frecuentemente no es el caso.

**PTI secundaria:** englobaría a todas las formas de trombocitopenia de mecanismo autoinmune, exceptuando la PTI primaria. En estos casos el acrónimo PTI debería ir seguido del nombre de la enfermedad asociada.

Dependiendo de su duración en el tiempo se distinguieron tres las fases de la enfermedad:

**PTI de nuevo diagnóstico:**  $<3$  meses de evolución.

**PTI persistente:** 3-12 meses desde el diagnóstico. En este grupo estarían los pacientes que no consiguen una remisión espontánea o que no mantienen la respuesta tras el fin de la primera línea de tratamiento. El objetivo de añadir este nuevo concepto se debe a que existe un grupo de pacientes que pueden alcanzar remisiones espontáneas durante este período, algo que ocurre con mayor frecuencia en población pediátrica sobre todo en aquellos casos asociados a una infección viral reciente (hasta 50-60% de los casos).

**PTI crónica:**  $>12$  meses de evolución.

El término de **PTI grave** se reserva para aquellos pacientes que presentan una hemorragia importante que obliga a iniciar o a modificar el tratamiento.

### **1.4.1.3 Manifestaciones clínicas**

Muchos pacientes diagnosticados de PTI no presentan ninguna sintomatología, en aquellos que presentan síntomas estos suelen estar relacionados con la cifra de plaquetas.

Hasta dos tercios de los pacientes pueden presentar clínica hemorrágica, habitualmente sangrado mucocutáneo. El fenotipo hemorrágico varía mucho de unos pacientes a otros, desde púrpura o equimosis de pequeña cuantía, epistaxis, hasta hemorragias de riesgo vital como, entre otras, hemorragias cerebrales o gastrointestinales.

La cifra de plaquetas se correlaciona con las manifestaciones hemorrágicas, aunque intervienen otros factores como la edad del paciente, su estilo de vida, o presencia de uremia.

Recientemente el IWG ha publicado una escala con el fin de estandarizar la evaluación de la clínica hemorrágica en los pacientes con PTI[69].

La fatiga es otro síntoma que pueden presentar estos pacientes, aunque no está claro el mecanismo por el que se produce, se ha sugerido que puede estar relacionado con la posible anemia debido a los sangrados a pesar de su cuantía leve en la mayoría de los casos, y al consiguiente déficit de hierro. Otra teoría sugiere que el estado pro-inflamatorio de la patología autoinmune pueda tener un papel en este síntoma que ha sido objeto de diversos estudios[70].

La mortalidad debida a hemorragia es infrecuente en estos pacientes, aunque los pacientes mayores de 60 años y aquellos con hemorragias previas tienen mayor riesgo de sangrado[71].

#### **1.4.1.4 Riesgo trombótico**

Diversas publicaciones indican un aumento del riesgo trombótico en los pacientes diagnosticados de PTI, el cual podría ser mayor en los pacientes tratados con AR-TPO o en aquéllos que se han sometido a una esplenectomía.

Recientemente, Rodedghiero publicaba una revisión de diversos estudios en los que el riesgo anual de eventos tromboembólicos en pacientes con PTI era de un 0.41-0.67, frente a un 0.2-0.42 en la población general. Los autores concluyen que parece existir un aumento en el riesgo trombótico en pacientes con PTI, modulado fundamentalmente por la edad y otros factores predisponentes para la trombosis. Y que este riesgo es mayor para los pacientes esplenectomizados, los cuales presentan hasta 3-4 veces más riesgo de eventos trombóticos [72].

Otro estudio retrospectivo publicado por Ruggeri cifra el riesgo anual de trombosis venosa en un 0.39, frente a un 0.71 en el caso de trombosis arterial. En este trabajo, la incidencia acumulada a los 5 años fue de 1.4% para trombosis venosa y 3.2% para arterial[73].

#### **1.4.1.5 Diagnóstico**

El diagnóstico de PTI es un diagnóstico de exclusión, deben descartarse en primer lugar otras causas que pudieran dar lugar a trombocitopenia. Es fundamental la realización de una adecuada historia clínica, examen físico, hemograma y extensión de sangre periférica con el fin de descartar patologías de riesgo vital como la trombocitopenia microangiopática o la leucemia aguda.



<b>Pruebas complementarias recomendadas para el diagnóstico</b>	
<b>Estudios sistemáticos iniciales</b>	Hemograma con reticulocitos Frotis de sangre periférica Estudio de coagulación Bioquímica básica de sangre y orina Dosificación de inmunoglobulinas
<b>Estudios de autoinmunidad</b>	Test de Coombs directo Anticuerpos antinucleares
<b>Estudios microbiológicos</b>	Marcadores serológicos: VIH, VHB, VHC
<b>Estudio de médula ósea</b>	Pacientes mayores de 60 años Refractarios a tratamiento de 1º línea Rasgos displásicos en sangre periférica Previo a indicación de esplenectomía
<b>Otros estudios a considerar según evolución clínica</b>	Anticuerpos antifosfolípido Función tiroides y anticuerpos anti-tiroideos Helicobacter pylori: prueba del aliento o antígeno en heces Otras serologías

**Tabla2. Pruebas complementarias recomendadas para el diagnóstico de la PTI.** Adaptada de Directrices de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la PTI: Documento de consenso. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia.

Recientemente ha sido publicado a nivel nacional un estudio de práctica clínica habitual en pacientes con PTI, este estudio de vida real puso de manifiesto que frecuentemente estas importantes medidas iniciales como la observación de la extensión de sangre periférica no se hacían siempre en la práctica clínica[74].

#### **1.4.1.6 Tratamiento**

El objetivo del tratamiento en la PTI no es normalizar la cifra de plaquetas, sino alcanzar una cifra segura para prevenir o parar la clínica hemorrágica (superior a  $20-30 \times 10^9/L$ ).

Previo a iniciar el tratamiento deben tenerse en cuenta una serie de cuestiones como la edad, comorbilidades, estilo de vida o preferencias del paciente, así como relativas a la patología como cifra de plaquetas o existencia de sangrado mayor previo. Deben tenerse en cuenta la presencia de factores de riesgo de sangrado adicionales como el empleo de tratamiento anticoagulante o antiagregante concomitante, historia de úlcera gastro-intestinal, insuficiencia hepática, hipertensión mal controlada entre otros, y evitar el empleo de fármacos innecesario vigilando la toxicidad y efectos secundarios.

Los criterios de inicio de tratamiento recogidos en el documento de consenso de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) para el manejo de PTI indican que se debe iniciar tratamiento si el paciente presenta una cifra de plaquetas  $< 20 \times 10^9/L$ , si la cifra de plaquetas está entre  $20-50 \times 10^9/L$  y el paciente presenta clínica hemorrágica o va a ser sometido a intervención quirúrgica o procedimiento invasivo entre otros. Con una cifra de plaquetas  $>50 \times 10^9/L$  en líneas generales, se desaconseja el inicio de tratamiento, salvo situaciones especiales como si va a ser sometido a cirugía del sistema nervioso central u ocular, o necesidad de tratamiento anticoagulante a dosis plenas.

##### **1.4.1.6.1 Tratamiento de primera línea**

En el tratamiento inicial de la PTI se recomienda el empleo de glucocorticoides o inmunoglobulinas en función de las características del paciente y la presencia o no de clínica hemorrágica.

#### **1.4.1.6.1.1 Corticoides**

El tratamiento de primera línea en la PTI son los glucocorticoides, cuyo mecanismo de acción consiste en la modulación de una gran cantidad de genes, estimulando cambios fisiológicos al unirse a los receptores citosólicos. Modulan la activación de las células B a través de la disminución de BAFF y modulando las CDs. En algunos estudios al combinarlos con rapamicina o rituximab se ha observado que tienen un efecto modulador sobre las células T al aumentar el número de Tregs circulantes, restaurando la ratio Th1/Th2 y normalizando la subpoblación Th17 aumentando IL-10 y TGF- $\beta$ [75, 76].

Los corticoides habitualmente empleados son la prednisona (PRD) a dosis de 1 mg/kg o dexametasona (DXM) a dosis de 40 mg/día durante 4 días, cada 2 semanas y hasta 3 ciclos). Aunque con la PRD la cifra de plaquetas aumenta en dos tercios de los pacientes, al ir descendiendo la dosis se observan frecuentemente recaídas. Remisiones de larga duración se observan en el 30% de los pacientes[77]. La principal ventaja de DXM con respecto a PRD, es la menor duración del tratamiento, facilitando la adherencia por parte del paciente y, probablemente, una respuesta más rápida y de mayor duración. En un estudio aleatorizado y multicéntrico, publicado recientemente por Matschke y cols. se comparaba PRD a dosis estándar con DXM ajustando la dosis al peso corporal y con una periodicidad de 3 semanas hasta un total de 6 ciclos. En este estudio encontraron que DXM inducía remisiones significativamente más duraderas que PRD en PTI de nuevo diagnóstico. Indicando que la eficacia de DXM aumentaba con el número de ciclos administrados, sugieren que mantener dosis altas de glucocorticoides tras la inducción de la remisión es fundamental para alcanzar un efecto a largo plazo. La dosis media equivalente acumulativa de cortisol en el brazo de PRD fue menor de la mitad que en el

de DXM, lo que correspondía con una alta proporción de fracaso al tratamiento. El mantenimiento de dosis altas de glucocorticoides durante un largo periodo de tiempo puede ser un dato fundamental para inducir remisiones de larga duración. Los efectos adversos fueron similares en ambos grupos. El insomnio fue un efecto secundario más frecuente en el grupo de DXM, mientras que las infecciones ocurrieron con más frecuencia en el de PRD[78].

En el estudio de Wei y cols. que también comparaba PRD con DXM a altas dosis, se refirió una respuesta inicial superior en el grupo de DXM tras 1-2 ciclos (82.1% vs 67.4%) y de respuestas completas (50.5% vs 26.8%). El tiempo hasta alcanzar respuesta también fue menor en el grupo de DXM. La respuesta sostenida fue similar en ambos grupos 40% con DXM vs 41.2% con PRD. Alcanzar una respuesta completa inicial fue un indicador positivo para alcanzar la respuesta sostenida, mientras que la presencia de anticuerpos antiplaquetarios fue un indicador negativo. Los autores concluyen que DXM a altas dosis puede ser preferible a PRD como tratamiento de primera línea en PTI en el adulto[79].

En general la tasa de respuesta a PRD, oscila entre un 40-70% a los 5-10 días, manteniéndose a largo plazo en un 30% de los casos. Los corticoides deben retirarse progresivamente, aunque no se recomienda mantenerlos más de 4 a 6 semanas, ya que mantener dosis de PRD superiores a 5-10 mg durante más tiempo puede provocar efectos adversos graves.

Entre los efectos secundarios que producen los corticoides están el aumento de peso, trastornos psíquicos, síndrome de Cushing, hipertensión arterial, diabetes, osteoporosis, osteonecrosis y miopatía esteroidea entre otros.

#### **1.4.1.6.1.2 Inmunoglobulinas**

Constituyen uno de los tratamientos de primera línea aceptados en las guías para la PTI. Es frecuente su empleo concomitante con glucocorticoides cuando se precisa un aumento rápido en la cifra de plaquetas debido a la clínica hemorrágica activa grave. Se ha descrito una tasa de respuestas de hasta el 90%, pero habitualmente de carácter transitorio limitadas a 2-6 semanas.

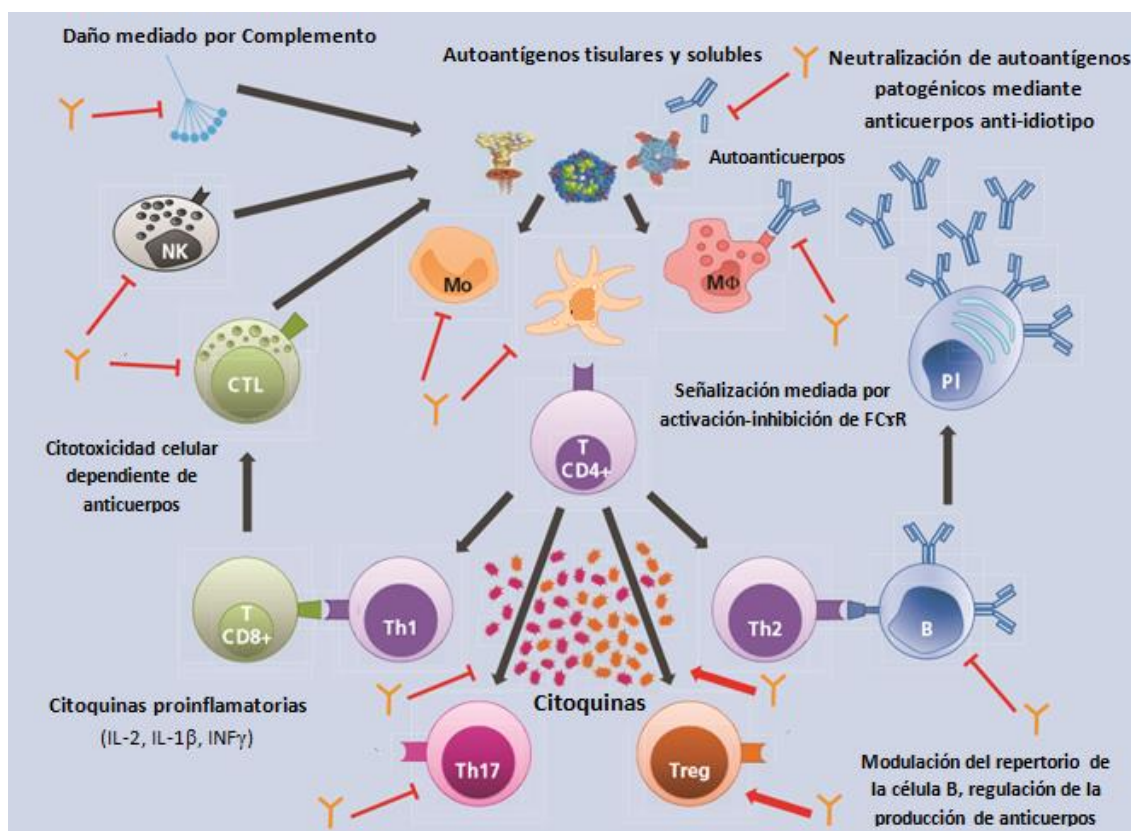
Las IgGs se administran por vía intravenosa, y se obtienen a partir del plasma de miles de donantes sanos, conteniendo IgG poliespecíficas. Con el objetivo de disminuir el riesgo de transmisión de patógenos, son sometidos a múltiples procesos de inactivación viral[80].

El mecanismo de acción por el que ejercen su efecto ha sido objeto de estudio en las últimas décadas, aunque no ha sido completamente clarificado. Se cree que ejercen su acción a distintos niveles:

- Bloqueando el receptor Fcγ de los macrófagos, de este modo inhiben la fagocitosis de las plaquetas en pacientes con PTI.
- Contribuyen a las funciones de las células supresoras T, que podrían ser responsables de la producción de Acs. Las inmunoglobulinas aumentarían el efecto supresor de estas células T. En el artículo de Ephrem y colabores se demostró que la administración de IGIV al aumentar la función de las células T reguladoras prevenía el desarrollo de encefalitis autoinmune en un modelo para esclerosis múltiple[81]. Es posible que mecanismos supresores puedan afectar a la liberación de citoquinas y activar a las células natural killer (NK).
- Al unirse al receptor FcR de las células B y de las células presentadoras de antígeno, ejercen una supresión sobre las células B, suprimiendo la producción

de Ig y autoanticuerpos por parte de éstas[82]. Los anticuerpos anti-idiotipo contenidos en las Ig son capaces de neutralizar anticuerpos específicos, como la GPIIb/IIIa en la PTI.

- Algunas publicaciones han demostrado la interacción de estas IGIV con el sistema del complemento en el contexto de la respuesta inmune.



**Figura 11. Efecto de las IGIV en el sistema inmune.** Las IGIV interactúan con varios componentes celulares y solubles del sistema inmune involucrados en el proceso inflamatorio y autoinmune: 1) Neutralizan autoanticuerpos patológicos a través de la red anti-idiotipo. 2) Modulan la expresión del receptor de la Fc e inhibe la maduración y activación de las CPA. 3) Regulan la síntesis de Ac y el repertorio de células B. 4) Alteran el balance entre los subgrupos de células T helper. 5) Bloquean la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos. 6) Bloquean la activación del complemento. (Adaptado de Gilardin, L., J. Bayry, and S.V. Kaveri, *Intravenous immunoglobulin as clinical immune-modulating therapy*. CMAJ, 2015. **187**(4): p. 257-64.

Estos efectos sobre el sistema inmune se han observado en casos de pacientes con PTI y con síndrome hemofagocítico donde se ha visto que las IGIV actúan evitando la

liberación de gran cantidad de citoquinas por parte de las células T activadas y macrófagos.

Se ha observado el efecto sobre los autoanticuerpos generados en la PTI evitando su producción y unión a las GP de membrana de las plaquetas.

En la PTI crónica, las células T están activadas resultando en una liberación de IL 2 que puede perpetuar la trombocitopenia. Tras la administración de IGIV se liberan citoquinas, receptores solubles de citoquinas y antagonistas de los receptores de IL 1, y los receptores de la Fc son modulados.

Por tanto las IGIV ejercen un efecto modulador tanto sobre las células de la respuesta inmune innata como adaptativa incluyendo CDs, monocitos y macrófagos, células NK, granulocitos, células B y varios subtipos de células T. Contribuye a la expansión de células T que intervienen de forma importante en el mantenimiento de la inmunotolerancia e inhiben la diferenciación y función de los linfocitos T helper 17 y T helper 1, que intervienen en procesos autoinmunes[83].

La dosis de administración recomendada es de 1g/kg durante 2 días ó 0,4 g/kg/día durante 5 días. Se han realizado numerosos estudios para tratar de determinar la dosis adecuada de administración de IGIV tanto en adultos como en niños, con el fin de objetivar si dosis inferiores podrían alcanzar una eficacia similar, si podrían influir en el curso de la enfermedad, y con el fin de optimizar costes[84-86]. En el artículo de Zhou se sugiere que pacientes no tratados previamente por PTI, y más jóvenes, obtienen una mejor respuesta a IGIV. La presencia de anticuerpos anti- GP Ib/V/IX, en ausencia de anticuerpos anti- GP IIb/IIIa predice una pobre respuesta a IGIV. En el estudio de Mayer y cols se estudió el efecto de las IGIV en 19 pacientes diagnosticados de PTI y se observó la resolución de la clínica hemorrágica en aquellos que la presentaban,

fundamentalmente muco-cutánea, en el transcurso de 12 horas desde el inicio de la infusión de IGIV. La cifra de plaquetas aumentó a una cifra segura o se duplicó en 16 de los pacientes. En 7 de ellos este aumento se detectó directamente tras la administración de IGIV, en tres adicionales una hora después, en dos más entre las tres y ocho horas, y en otros cuatro pacientes tras 16-24 horas. Solamente tres de los pacientes no respondieron a tratamiento. Sugieren que el hecho de que la clínica hemorrágica cesara todos los pacientes que la presentaban en 12 horas, independientemente de si elevaron cifra de plaquetas, podría explicarse porque el incremento en la cifra de plaquetas podría verse encubierto, al menos parcialmente, por un aumento en el consumo de las plaquetas y una hemostasia descompensada en aquellos pacientes con sangrado, sugiriendo que todas o al menos una gran cantidad de las plaquetas serían consumidas en la restauración del endotelio lesionado y en parar la hemorragia [87]. Concluyen que el efecto terapéutico de las IGIV parece empezar antes de lo que previamente se había sugerido e indican que la elevación en la cifra de plaquetas no determina estrictamente la respuesta real a IGIV, dado que una considerable cantidad de plaquetas podrían estar siendo consumidas por sangrados o microsangrados objetivables u ocultos. Este efecto en la elevación en la cifra de plaquetas ocurriría no sólo por la inhibición de la fagocitosis, sino por un efecto en el aumento de la producción de plaquetas, que podría ocurrir por la capacidad de las IGIV de estimular una rápida liberación de agonistas de IL 1 $\alpha$ , esta IL 1 $\alpha$  ha demostrado en modelos murinos inducir la ruptura de los megacariocitos resultando así en un aumento de las plaquetas circulantes[88]. Se ha sugerido también que otro posible mecanismo sería que las IGIV ejerciesen una acción inhibitoria sobre las células endoteliales.



Se trata de una medicación bien tolerada con efectos secundarios habitualmente leves y transitorios. Se han descrito efectos secundarios graves, pero menos frecuentes como sobrecarga de volumen, fallo renal agudo, tromboembolismo, o anafilaxia. Se han descrito casos de meningitis aséptica 48-72 h tras la infusión en probable relación con la liberación de citoquinas proinflamatorias y la presencia de inmunoglobulinas anticuerpos anti-neutrófilo citoplasmáticos (ANCA)-like.

La administración conjunta de IGIV y corticoides disminuye las reacciones durante la infusión y contribuye a prevenir las meningitis asépticas.

Se debe tener en cuenta que los preparados contienen pequeñas cantidades de IgA, que podrían dar reacciones anafilactoides en pacientes con deficiencia de IgA. En estos casos hay que usar preparados de IGIV deficientes en IgA.

#### **1.4.1.6.2 Tratamiento de segunda línea**

Si no se consigue respuesta con los tratamientos de primera línea se iniciará un tratamiento de segunda línea entre los que destacan la esplenectomía, AR-TPO o agentes inmunosupresores como el rituximab. El objetivo de esta segunda línea es alcanzar una cifra de plaquetas segura de forma mantenida, con el fin de evitar la aparición de episodios hemorrágicos.

##### **1.4.1.6.2.1 Esplenectomía**

Tradicionalmente se ha considerado como el único tratamiento curativo de la enfermedad. Se considera el tratamiento con mayor tasa de remisiones completas duraderas. Dado que se han descrito remisiones espontáneas de la enfermedad se recomienda retrasarla un mínimo de seis meses desde el diagnóstico. Por este motivo,

Rodeghiero introdujo el concepto de PTI persistente, para esperar la probable remisión espontánea antes de realizar tratamientos más agresivos como la esplenectomía[44].

Con la esplenectomía se han descrito de un 60% a 70 %de repuestas, la mayoría de ellas duraderas, aunque aproximadamente un tercio de los pacientes recaen a los 5 años[89].

En cuanto a la edad se refiere, un trabajo publicado en 2004 por Kojouri et al, puso de manifiesto que los pacientes menores de 65 años responden mejor a la cirugía que los mayores de esta edad, con tasas de respuesta de un 92% y un 79% respectivamente[90-92].Otros factores predictores de buena respuesta descritos son el sexo femenino, sensibilidad a corticoides previa y cifras de plaquetas más elevadas en el momento de realización de esplenectomía[93-95]. Sin embargo, tiene una mayor tasa de complicaciones que otras cirugías abdominales e implica un aumento de riesgo de infecciones, no solo por bacterias encapsuladas, sino también por virus[96]. Con una correcta vacunación puede disminuirse la incidencia de estas infecciones. En un artículo publicado por Moulis recientemente hace referencia a que sólo un 58% de los pacientes esplenectomizados en Francia reciben vacunación antineumocócica, con el consiguiente riesgo de infección en todos aquellos que no la reciben [97]. Además del riesgo infeccioso se ha asociado también a un mayor riesgo trombótico y de patologías hematológicas o tumorales[98, 99]. Se ha observado una disminución importante de las complicaciones quirúrgicas con la introducción de la esplenectomía laparoscópica con una tasa de complicaciones de 9.6% frente a un 12% con laparotomía, con una mortalidad de un 0.2% frente a un 1% con laparotomía[92, 100].

Según el documento consenso del grupo internacional, las Guías Españolas y las alemanas, el procedimiento estaría contraindicado en pacientes mayores de 65 años

con comorbilidad asociada, obesidad, adherencias por cirugías previas o infecciones graves.

En el estudio de Palandri y cols. se hace referencia que en los últimos años tras la introducción del rituximab y AR-TPO, se ha observado un retraso en la realización de esplenectomía pasando a ser un tratamiento de tercera línea, teniendo en cuenta que esta demora no reduce las tasas de respuesta ni aumenta el riesgo perioperatorio[101].

#### **1.4.1.6.2.2 Agonistas de la trombopoyetina**

Tras conseguir la purificación y clonación de la TPO humana en 1994, se inició el desarrollo de los AR-TPO, inicialmente se desarrollaron dos de primera generación, uno de ellos era una TPO recombinante humana(rhTPO), y la otra un factor de crecimiento de los megacariocitos recombinante pegilado (PEG-rh MGDF). Se realizaron múltiples ensayos clínicos con estos agentes en pacientes con trombocitopenia de distinta etiología, pero fueron retirados del mercado debido a la formación de anticuerpos con reacción cruzada frente a la TPO endógena en los sujetos incluidos en estudio[102]. Los AR-TPO de segunda generación fueron desarrollados específicamente para no tener ninguna homología con la TPO endógena. Estos AR-TPO se comenzaron a utilizar para el tratamiento de la PTI, y presentan la ventaja de tener un mecanismo de acción totalmente diferente a los tratamientos utilizados hasta entonces.

El mecanismo de acción fundamental de estos AR-TPO consiste en el estímulo de la producción de plaquetas por parte de los megacariocitos. En un estudio reciente llevado a cabo por Bao y cols. se ha observado que las plaquetas en pacientes en tratamiento con AR-TPO pueden tener un papel en la estimulación de las células T reguladoras (Tregs), ya sea directa o indirectamente a través de un aumento en la liberación de TGF-

$\beta 1$  como resultado de un mayor recambio plaquetario, concluyendo que los AR-TPO en pacientes con PTI tienen un profundo efecto en la restauración de la inmunotolerancia[103].

Por otro lado, el tratamiento con AR-TPO puede reparar los defectos en las células B reguladoras (Bregs) en la regulación inmune en pacientes con PTI.

Los receptores Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ Rs) son un grupo heterogéneo de proteínas de membrana que proveen importantes sitios de unión entre inmunidad humoral y celular. Funcionalmente se pueden diferenciar entre los distintos tipos algunos que son activadores como Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa y Fc $\gamma$ RIII y el receptor inhibidor Fc $\gamma$ RIIb. La unión a Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa y Fc $\gamma$ RIII lleva a la activación de células inflamatorias como monocitos, macrófagos o neutrófilos a través de un motivo de inmunoreceptor activable por tirosina (ITAM). Mientras que la unión a Fc $\gamma$ RIIb inhibe las funciones de los Fc $\gamma$ Rs activadores a través de un motivo de inmunoreceptor inhibitorio por tirosina (ITIM). El balance entre los Fc $\gamma$ Rs activadores e inhibidores determina la magnitud de la respuesta celular. Se ha demostrado que un desequilibrio entre los Fc $\gamma$ Rs activadores e inhibidores juega un papel fundamental en determinadas patologías autoinmunes como artritis reumatoide o lupus eritematoso. En la PTI la destrucción plaquetar se lleva a cabo por autoanticuerpos dirigidos frente a las GP plaquetares, la mayoría de clase Ig G1. Estos complejos formados por las plaquetas cubiertas por dichos anticuerpos son propensos a ser fagocitados a nivel de los Fc $\gamma$ Rs de los macrófagos. En modelos murinos romiplostim demostró estimular significativamente la expresión inhibitoria de Fc $\gamma$ RII y disminuir la expresión activadora de Fc $\gamma$ RI. Se ha demostrado que el tratamiento con eltrombopag aumenta la expresión de Fc $\gamma$ RIIb y disminuye la de Fc $\gamma$ RIIa y Fc $\gamma$ RI en los monocitos de los pacientes con PTI. Por todo ello, parece que los AR-TPO pueden

atenuar la activación monocitaria mediada por FcγR al modificar el balance entre los FcγR a través de la inhibición de FcγRIIb[104].

Actualmente ambos AR-TPO, romiplostim y eltrombopag están aprobados por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) para pacientes adultos con PTI. Recientemente ha tenido lugar un cambio en su ficha técnica, están indicados en pacientes con crónica que son refractarios a otros tratamientos (por ejemplo corticoides e IGIV) no siendo necesario que esté contraindicada la esplenectomía. Al introducir la palabra crónica, dejaría fuera de indicación cuando se utiliza en pacientes con PTI persistente, a pesar de que en la práctica clínica el empleo de AR-TPO en este tipo de pacientes es frecuente.

El **romiplostim** es una proteína recombinante compuesta por dos dominios. Un dominio peptídico, compuesto por cuatro péptidos, capaz de unirse al receptor de la trombopoyetina endógena (eTPO) y un dominio transportador constituido por dos fragmentos Fc de IgG1, que contribuye a prolongar su vida media en la circulación. El dominio peptídico no tiene homología con la eTPO lo cual evita la aparición de anticuerpos que la neutralicen. Estimula el crecimiento y la maduración de los megacariocitos mediante su unión al receptor Mpl de la misma manera que la eTPO, vía JAK2, STAT5, P38 MAPK y AKT. La administración de este fármaco es por vía subcutánea con una periodicidad semanal, siendo la dosis de 1 a 10 µg/kg de peso, realizando los distintos ajustes de dosis en función de la cifra de plaquetas siguiendo las recomendaciones recogidas en ficha técnica.

La tasa de respuesta se ha estimado en ≥90% en pacientes. Distintos grupos han estudiado la respuesta a este fármaco en un amplio grupo de pacientes, coincidiendo en que se trata de un fármaco eficaz y seguro en el tratamiento de la PTI[105-107].

Los dos estudios pivotaes para evaluar eficacia y seguridad de romiplostim fueron 2 estudios paralelos, multicéntricos, randomizados, doble-ciego, fase III, con un diseño similar en ambos, salvo que uno de ellos incluyó pacientes no esplenectomizados y el otro se realizaba en pacientes que habían sido sometidos a esplenectomía al menos 4 semanas antes de entrar en el estudio. Los individuos eran aleatorizados para recibir placebo o romiplostim subcutáneo semanal durante un total de 24 semanas[108]. Se consideró como respuesta (una cifra de plaquetas  $\geq 50 \times 10^9/L$ ). La mayoría de los pacientes no esplenectomizados alcanzaron respuesta a las 3 semanas y los esplenectomizados a las 4 semanas. La dosis media de romiplostim necesaria para mantener un recuento plaquetar de  $\geq 50 \times 10^9/L$  fue de  $3 \mu g/kg$  en pacientes esplenectomizados frente a  $2 \mu g/kg$  en aquellos no esplenectomizados.

En el estudio de extensión, donde se incluyeron 292 pacientes diagnosticados de PTI, donde se incluyeron pacientes esplenectomizados o no, el 95% de los pacientes alcanzaron respuesta con el tratamiento, entendiendo como tal un recuento plaquetario  $\geq 50 \times 10^9/L$ , manteniendo esta respuesta el 92% del tiempo del estudio. En este estudio también se evaluó la posibilidad de auto-administración de romiplostim por el paciente, en aquellos que mantuvieron la misma dosis de romiplostim durante al menos 3 semanas consecutivas manteniendo la respuesta, lo que fue posible en el 82% de los pacientes[105].

Newland y cols. llevaron a cabo un estudio prospectivo en pacientes que se encontraban en PTI persistente con el objetivo de ver el porcentaje de pacientes que alcanzaban la respuesta y número que la mantenía tras discontinuar el agonista. Así, el objetivo principal del estudio fue determinar el tiempo que los pacientes incluidos estaban con una cifra de plaquetas  $\geq 50 \times 10^9/L$  durante el año del estudio, y el objetivo secundario

determinar la incidencia de remisión o esplenectomía, y de efectos adversos (EAs). Se concluyó que la tasa de respuesta, en estos pacientes que se encontraban en PTI persistente era superior al 90%, más rápida (mediana de tiempo: 2 semanas), y mantenida (mediana de tiempo 11 de los 12 meses) que la descrita en estudios previos. Además el porcentaje de pacientes que pudieron discontinuar el AR-TPO manteniendo la respuesta fue mayor en pacientes que se encuentran en la fase persistente de la enfermedad. Se observó remisión en el 32% de pacientes, con una mediana de tiempo hasta el inicio de remisión de 27 semanas (6.5 meses). Únicamente se realizó una esplenectomía en un paciente. No se observaron nuevas señales de seguridad[109].

Steurer y cols. en un estudio de vida real llevado a cabo a nivel europeo, incluyendo pacientes de 7 países, encuentran una disminución en la tasa de sangrado y necesidad de hospitalización de los pacientes con PTI tratados con romiplostim, con un perfil de seguridad aceptable. Refieren encontrar una tasa de respuestas con un recuento medio plaquetario alcanzado comparable al de los ensayos previos. Un 39% de los pacientes habían sido tratados previamente con rituximab, indicando que romiplostim es una opción terapéutica eficaz en aquellos pacientes que han recibido rituximab previamente. En un 10% de los pacientes se pudo discontinuar el tratamiento al alcanzar las plaquetas un rango hemostático, algunos de éstos fueron posteriormente sometidos a esplenectomía o se les administró rituximab, lo que podría haber influido en el mantenimiento de la respuesta. La incidencia de eventos trombóticos fue de 2 por cada 100 pacientes/año, y en 2 casos que recibieron romiplostim a altas dosis se objetivó fibrosis reticulínica a nivel medular. 14% de pacientes recibían tratamiento concomitante con aspirina o anticoagulantes orales, lo que no demostró aumentar el riesgo de clínica hemorrágica respecto al resto de la población de estudio. El 37% de los

pacientes se auto- administraron el romiplostim, lo que apoyaría la mejora en la calidad de vida del paciente[106].

Hasta un 87% de los pacientes permiten retirar o disminuir la medicación concomitante para el tratamiento de la PTI.

Entre los efectos adversos descritos los que se presentan con mayor frecuencia son cefalea, fatiga, epistaxis y artralgias. Los que revisten mayor gravedad son la formación de reticulina en MO y la posible aparición de complicaciones trombóticas.

**Eltrombopag** es una molécula pequeña, no peptídica activa por vía oral. Interacciona de manera selectiva con el receptor de la TPO, uniéndose a la porción transmembrana del receptor de la TPO en lugar de al sitio de unión de la rh-TPO endógena, donde se une el romiplostim. Al unirse al receptor activa la vía de señalización JAK2/STAT estimulando la producción de plaquetas. Al ser independiente al de la TPO hace que tenga un efecto aditivo.

La dosis de inicio para su administración es de 50 mg/día vía oral, considerando que en las 4 horas previas y las 2 después de su administración se deben evitar fármacos como antiácidos, calcio o suplementos vitamínicos para facilitar su correcta absorción. En pacientes de origen asiático o con insuficiencia hepática grave la dosis inicial será inferior comenzando con 25 mg al día.

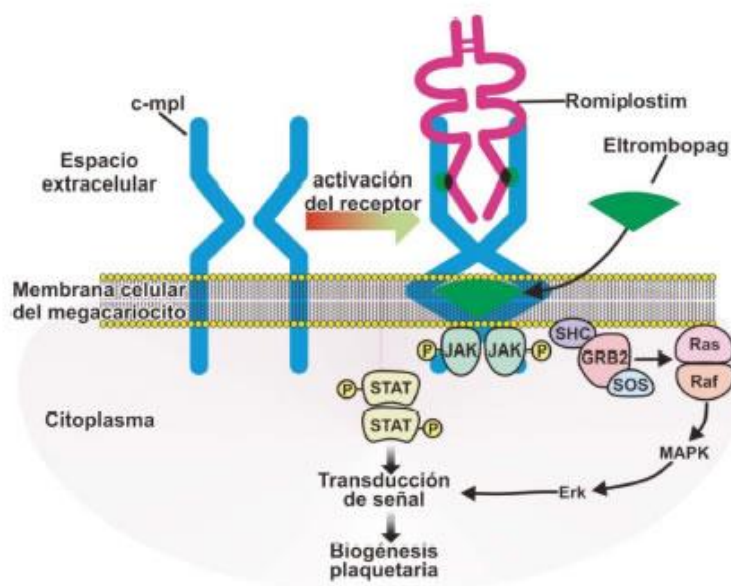
En el estudio de extensión que incluyó 302 pacientes, llevado a cabo por Bussel para evaluar la eficacia y seguridad de este fármaco a largo plazo se incluyó una evaluación del sangrado según la escala de la OMS. El estudio concluyó que el 85.8% de los pacientes alcanzaron respuesta, considerando como tal una cifra de plaquetas  $\geq 50 \times 10^9/L$  en algún momento del estudio, sin precisar tratamiento de rescate. Alcanzaron mejor respuesta aquellos pacientes no esplenectomizados. La incidencia de episodios



hemorrágicos en la primera visita era de un 57% y disminuyó hasta un 14% a los 5 años. 42 de los 101 pacientes que recibían tratamiento concomitante al inicio pudieron discontinuar el mismo. En cuanto a los eventos tromboembólicos, se detectaron 23 eventos tromboembólicos en 19 pacientes (6%), siendo trombosis venosa profunda en 6 pacientes, accidentes cerebro-vasculares en 3 pacientes, infarto agudo de miocardio en 4 pacientes, 2 presentaron accidente isquémico transitorio y 8 otros eventos tromboembólicos. La tasa de incidencia fue de 2.53/100 pacientes/año (95% CI, 1.52-3.95). No se objetivó asociación entre los eventos tromboembólicos y la cifra de plaquetas (sólo en 3 de los 19 pacientes hubo correlación).

Otros de los efectos adversos en los que se prestó especial atención fueron la fibrosis medular, observando que en la mayoría de los pacientes el grado de mielofibrosis (MF) fue de 0 ó 1, en once de los pacientes se encontró un grado de MF de 2 ó 3 en al menos una biopsia. Respecto a la toxicidad hepática 15% de los pacientes incluidos en el estudio tuvieron efectos adversos hepatobiliares, aunque ninguno grado 4. Entre los de grado 3 se detectaron: elevación de alanina amino-transferasa (ALT) en 2% de los pacientes, elevación de aspartato amino-transferasa (AST) en 2%, hiperbilirrubinemia, aumento de fosfatasa alcalina (FAL) o de ALT ó AST en <1%. Nueve pacientes discontinuaron el estudio: 8 por elevación de transaminasas y 1 por hiperbilirrubinemia. No se detectaron nuevos efectos adversos en el estudio, concluyendo que se trata de un fármaco eficaz y bien tolerado.

Entre los efectos adversos descritos con eltrombopag los más frecuentes son cefalea, diarrea, náuseas, fatiga y artralgiás. Otros más graves incluyen hepatotoxicidad, que cuando ocurre suele ser leve, reversible y sin secuelas clínicas, y riesgo de trombosis.



**Figura 12. Mecanismo de acción de los AR-TPO.** Romiplostim se une al receptor de la eTPO y un dominio transportador constituido por dos fragmentos Fc de IgG1, que contribuye a prolongar su vida media en la circulación. Eltrombopag se une a la porción transmembrana del receptor de la TPO en lugar de al sitio de unión de la rh-TPO endógena. (Imagen adaptada de Rivadeneyra L et al. Acta Bioquím Clín Latinoam 2016; 50 (2): 233-45.

### Cambio de un agonista a otro (switch)

En el estudio de cambio de un agonista a otro llevado a cabo por Khellaf y cols. se incluyeron 46 pacientes diagnosticados de PTI. Los motivos de cambio de un agonista a otro fueron pérdida de eficacia en 23 de los casos, preferencia del paciente en 8, cifra de plaquetas fluctuante en 11 o a consecuencia de los efectos secundarios en 4. Con el cambio de agente se alcanzaron respuestas en un 50-80% de los pacientes, las fluctuaciones desaparecieron en un 54%, y los efectos adversos se resolvieron en un 100%[110].

En otro estudio llevado a cabo por Cantoni y cols. se recogieron 249 pacientes tratados con AR-TPO entre 2009 y 2015. De éstos en 57 (22.9%) se cambió de un agonista a otro, 45.6% cambió de eltrombopag a romiplostim y 54.4% de romiplostim a eltrombopag. 73.7% alcanzó la dosis máxima del agonista que se le estaba administrando antes de

cambiar, como recomienda en ficha técnica. En el 47.4 % de los cambios el motivo fue la falta de respuesta al agonista inicial, pérdida de la respuesta al agonista en el 12.1%, fluctuación de la cifra de plaquetas en el 10.5%, preferencia del paciente en el 12.3% y efectos secundarios en el 8.8% de los casos.

El 56.1% del total de pacientes alcanzó, recuperó o mantuvo la respuesta después del cambio. En los pacientes en los que se cambió por razones de eficacia, respondió el 48.1% al nuevo agonista. Y en este subgrupo de pacientes, el tiempo de evolución de la PTI y las líneas de tratamiento previas recibidas, sin incluir esplenectomía, parecen ser un factor pronóstico para alcanzar la respuesta con el segundo AR-TPO. El 72% mantienen la respuesta cuando se cambia por otras razones. No se encontraron diferencias para alcanzar la respuesta entre el cambio de eltrombopag a romiplostim ni a la inversa.

En un estudio realizado a nivel español por González Porras et al se evaluó la eficacia de cambio de tratamiento de romiplostim a eltrombopag, donde se incluyeron 51 pacientes diagnosticados de PTI crónica. Los motivos para realizar el cambio de agonista fueron la pérdida de eficacia en 25 pacientes, preferencia del paciente en 16, cifra de plaquetas fluctuante en 6 o debido a efectos secundarios en 4. La mediana de utilización de Romiplostim previo al cambio de agonista fue de 12 meses (5-21 m). Tras el cambio de agonista la tasa de respuesta fue del 80% (41/51), y un 67% de los pacientes alcanzaron respuesta completa (n = 35). 31 pacientes mantuvieron la respuesta después del cambio, con un seguimiento de 14 meses. La eficacia se mantuvo después del cambio en todos los pacientes en los que se realizó por preferencia del paciente, fluctuación en el número de plaquetas o efectos secundarios[111].

### Discontinuación del agonista

Desde el año 2011 se han comenzado a comunicar casos aislados, en los que ha sido posible discontinuar el AR-TPO manteniéndose el recuento de plaquetas estable.

Bussel comunica una revisión de los casos en los que se ha podido documentar una remisión, considerando como tal mantener un recuento plaquetar  $\geq 50 \times 10^9/L$  durante  $\geq 26$  semanas consecutivas tras retirar Romiplostim y otras medicaciones para el tratamiento de la PTI. Las limitaciones del estudio que presenta consisten en que el análisis no fue diseñado para estimar ratios de respuesta y no se pudo calcular correctamente el número de pacientes evaluables, dado que al no estar realizado el estudio con este objeto, no se discontinuó el tratamiento más que en pacientes con una cifra de plaquetas  $\geq 400 \times 10^9/L$ , como figuraba en ficha técnica antes de su modificación. Además en este estudio los datos de seguimiento no estaban disponibles en todos los casos[112]

En los estudios llevados a cabo por Stasi y Newland se objetivó remisión en el 32% de pacientes, siendo la mediana de tiempo para comenzar la remisión de 27 semanas (6.5 meses)[109].

En el estudio realizado por el grupo francés donde se incluyeron 54 pacientes reclutados en tres centros diferentes el objetivo era determinar el porcentaje de pacientes que mantuvieron la respuesta tras discontinuar el tratamiento con el AR-TPO, y características de estos pacientes. Se incluyeron en este estudio pacientes adultos diagnosticados PTI primaria en los últimos 5 años y que habían recibido al menos un AR-TPO. Como criterios de respuesta se consideró respuesta completa cuando alcanzaron una cifra de plaquetas de  $>100 \times 10^9 /L$ , o respuesta si mantenían  $>30 \times 10^9 /L$  y un aumento de al menos el doble de su cifra basal. Ocho pacientes alcanzaron respuesta, y

7 de ellos respuesta completa. Todos ellos estaban diagnosticados de PTI crónica, con un tiempo desde el diagnóstico de la PTI hasta el comienzo del AR-TPO de 103 meses (13-297). La mediana de líneas de tratamiento recibidas previas fue de 5 (2-12). El tiempo de tratamiento con AR-TPO fue de 1 mes en tres pacientes y en los otros cinco 24 meses (5-48). Concluyen los autores que no se identificaron factores predictores de respuesta, siendo más probable alcanzarla en aquellos pacientes que alcanzan una respuesta completa (RC) inicial (29%). Los pacientes que recayeron tras retirada del AR-TPO no tuvieron ningún episodio hemorrágico[113].

En un estudio español llevado a cabo por González-López et al. Se incluyeron 12 pacientes. Siete con PTI crónica, 4 de nuevo diagnóstico y uno con PTI persistente. La mediana de líneas de tratamientos previos recibidos fue de 5, 7 pacientes estaban esplenectomizados y 4 habían recibido tratamiento previo con Romiplostim (3 cambiaron por falta de respuesta y 1 por decisión propia). Cuatro de los pacientes requirieron tratamiento concomitante al inicio. La mediana de duración del tratamiento fue de 5 meses (1-13). En tres pacientes la duración del tratamiento fue menor de un mes. Un solo paciente recayó tras suspender el trombotopag. Tras 8 meses de retratamiento, se suspendió nuevamente consiguiendo la remisión durante 6 meses. La mediana de seguimiento sin tratamiento fue de 7 meses (6 -20). Diez de los pacientes mantuvieron plaquetas  $>100 \times 10^9/L$ . En todos los pacientes mejoró la sintomatología hemorrágica[114].

En un estudio de discontinuación posterior, donde se recogieron 260 pacientes adultos con PTI, donde el tiempo medio desde el diagnóstico hasta el inicio de el trombotopag fue de dos años, se observó que hasta el 40% de los pacientes que alcanzaron RC

mantuvieron la respuesta tras la suspensión del tratamiento. No fue posible identificar los factores predictores de respuesta mantenida tras discontinuación[115].

En el estudio prospectivo de Bussel el objetivo consistía en evaluar qué porcentaje y tipo de pacientes pueden discontinuar el tratamiento a largo plazo, para ello se incluyeron pacientes con dosis igual o menor a 75 mg/d durante al menos 4 meses. En aquellos pacientes con plaquetas  $>50 \times 10^9/L$ , se disminuía la dosis en un 10-20% cada 4 semanas durante 2 años. De los 32 pacientes incluidos en el estudio el 33% pudieron discontinuar y mantuvieron la respuesta (10 de 32 pacientes). Se objetivó que aquellos pacientes que habían recibido durante más tiempo el agonista tenían más probabilidades de discontinuar el tratamiento[116].

De todos estos estudios de discontinuación se deduce que parecen tener más posibilidades de alcanzar una respuesta mantenida tras la suspensión del fármaco aquellos pacientes diagnosticados de PTI persistente, los que alcanzan respuesta completa, porcentaje de plaquetas reticuladas (cuanto menor sea el porcentaje de plaquetas inmaduras, mayor probabilidad de éxito al discontinuar el tratamiento), y los niveles de APRIL.

#### **1.4.1.6.2.3 Rituximab**

Este anticuerpo monoclonal desarrollado en la década de 1990 para el tratamiento de los linfomas no Hodgkin ha sido empleado durante la última década en el tratamiento de pacientes con PTI refractaria con buenos resultados, aunque no tiene indicación aprobada en ficha técnica para su uso en esta patología.

Es un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido contra el receptor CD20 de los linfocitos B. Se cree que induce la apoptosis de los linfocitos B o destrucción a nivel esplénico a

través de la vía de citotoxicidad complemento-dependiente o anticuerpo-dependiente, la consiguiente depleción de linfocitos B resulta en una disminución en el título de anticuerpos antiplaquetarios y en la normalización del balance de los linfocitos T [117, 118]. Esto sugiere que el mecanismo de acción del rituximab puede contribuir indirectamente a la regulación de los linfocitos T.

En general, se utiliza a una dosis de 375 mg/m<sup>2</sup>/semana durante 4 semanas [119, 120]. Aún así, se han descrito pautas con dosis más bajas de 100 mg/m<sup>2</sup>/semana durante 4 semanas, que también resultan eficaces, aunque parece que la duración de la respuesta podría ser menor que con la dosis estándar [121-123]. En un estudio reciente se compara la dosis estándar de rituximab con dosis más altas 1000 mg los días 1 y 15 como las empleadas en el tratamiento de otra patología autoinmune, la artritis reumatoide. De los 107 pacientes incluidos en el estudio el 57% recibió la dosis estándar de rituximab, frente al 46% que recibió dosis altas. A los 12 meses el 36% de los pacientes tratados con dosis estándar y el 50% de los tratados con dosis altas alcanzaron respuesta, con unos efectos secundarios equiparables en ambos grupos, concluyendo los autores que el protocolo con dosis altas es eficaz y seguro en el tratamiento de la PTI [124].

Con el régimen estándar responden aproximadamente el 60% de los pacientes, alcanzando respuesta completa un 40% de ellos. A los 5 años únicamente un 15-20% de los respondedores mantiene una respuesta sostenida. La respuesta ocurre entre la 1ª-2ª semanas, pudiendo producirse hasta la 6ª u 8ª semanas después de iniciarse el tratamiento. En caso de recaída pasados los doce meses del tratamiento podría administrarse nuevamente rituximab pudiendo presentar respuesta nuevamente.

En un estudio italiano prospectivo, aleatorizado, en el que se comparó DXM en monoterapia frente DXM con rituximab se ha observado una mayor tasa de respuesta cuando se combina Rituximab con altas dosis de DXM como tratamiento inicial[125].

No existen claros predictores de la respuesta a rituximab, aunque en su estudio Bussel indica que un intervalo entre el diagnóstico de PTI y tratamiento con rituximab menor de 24 meses, el sexo femenino y alcanzar una respuesta completa tras el tratamiento con rituximab, podrían ser predictores de respuesta sostenida[126].

En cuanto a los efectos adversos, las infecciones representan la complicación a largo plazo más frecuente. En el estudio de Marangon y cols., donde se incluyeron 103 pacientes tratados con rituximab la incidencia de complicaciones infecciosas fue de aproximadamente 5% sin observar en ninguno de los casos leucoencefalopatía multifocal progresiva, descrita en otros estudios en pacientes tratados con rituximab[127]. Debe administrarse con precaución en pacientes con VHB positivo, ya que podría reactivarse la enfermedad pudiendo desencadenar una hepatitis fulminante.

#### **1.4.1.6.3 Tratamiento de tercera línea**

En casos donde los tratamientos previos no han surtido respuesta, existen otras opciones terapéuticas disponibles.

#### **Otros tratamientos inmunosupresores**

Además del rituximab, existen diversos fármacos inmunosupresores que se han utilizado en el tratamiento de la PTI como la ciclofosfamida, la azatioprina, la ciclosporina A, el danazol, la ciclofosfamida, la dapsona o el micofenolato.



#### **1.4.1.6.4 Tratamiento en pacientes refractarios**

En pacientes refractarios se ha sugerido que combinar un tratamiento inmunosupresor con un AR-TPO podría potenciar el efecto de este último. Esta combinación podría resultar más efectivo que el tratamiento secuencial, y podría ser de utilidad en circunstancias donde se precise un tratamiento que eleve la cifra de plaquetas de forma más rápida, como en pacientes malos cumplidores o previo a una cirugía. La forma óptima de desescalar el tratamiento no está clara, probablemente dependa de la contribución de cada uno de los tratamientos a la respuesta, algo que no es fácilmente identificable. Se ha sugerido que cuantificar las plaquetas reticuladas, podría correlacionarse con el grado de destrucción plaquetar periférica[128].

##### **1.4.1.6.4.1 Oseltamivir**

En estudios recientes se ha observado el efecto que este fármaco puede tener en un grupo seleccionado de pacientes diagnosticados de PTI.

En la PTI el mecanismo de destrucción plaquetaria varía en función de las GP de membrana frente a las que van dirigidas los anticuerpos. Anticuerpos frente a la GP IIb/IIIa causan la opsonización de las plaquetas que serán destruidas al unirse a la fracción constante de las inmunoglobulinas a sus receptores presentes en los macrófagos esplénicos[129, 130]. Anticuerpos dirigidos frente a las GP Ib/V/IX producen una traslocación de la neuraminidasa de los gránulos a la superficie plaquetaria, lo que lleva a una pérdida de ácido siálico en la GPIb/V/IX. Estas plaquetas carentes de ácido siálico son retenidas en los receptores de Ashwell-Morell de los hepatocitos donde son destruidas [131].

El mecanismo de acción del oseltamivir consiste en que al inhibir la neuraminidasa, mejora la sialización de las GPs de membrana plaquetarias, evitando la interacción con los receptores de Ashwell-Morell de los hepatocitos, evitando por tanto la destrucción de las plaquetas.

Se han publicado pocos casos de tratamiento de pacientes con PTI con oseltamivir, aunque en casos seleccionados de pacientes con anticuerpos dirigidos frente a las GPs Ib/V/IX podría resultar una opción terapéutica [132, 133].

## **2.HIPÓTESIS**

En situaciones de trombocitopenia existe un riesgo aumentado de presentar clínica hemorrágica.

La trombocitopenia inmune (PTI) cursa habitualmente con una cifra de plaquetas bajas, sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en la trombocitopenia de origen central, los pacientes con PTI no suelen tener manifestaciones hemorrágicas graves.

Los pacientes con PTI presentan una gran variabilidad en sus manifestaciones clínicas. La decisión de iniciar tratamiento y la elección del mismo depende en parte de la evolución del recuento plaquetario, pero fundamentalmente de la sintomatología que presenten los pacientes.

De lo referido anteriormente se pone de manifiesto que existe una gran variabilidad en la respuesta a los agentes terapéuticos, lo que incide negativamente sobre la calidad de vida del paciente y aumenta el coste económico del tratamiento y la atención sanitaria ya que no se puede anticipar si el tratamiento a aplicar será el adecuado. Esta variabilidad podría deberse a que los pacientes con PTI presentan características funcionales y clínicas distintas que dependen del grado de participación de los mecanismos etiopatogénicos conocidos y de los que quedan por identificar en el desarrollo de la enfermedad.

La ausencia de clínica hemorrágica en algunos pacientes podría deberse a la presencia de algún mecanismo hemostático compensatorio. De hecho, se ha descrito que los pacientes con PTI tienen un mayor riesgo trombótico, en particular, aquellos que han sido sometidos a esplenectomía.

### **3.OBJETIVO**

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar las diferentes características de la hemostasia en pacientes con trombocitopenia de origen periférico (PTI) que responden a distintos tratamientos (IGIV, corticoides, AR-TPO, esplenectomía).

Como objetivos secundarios nos planteamos:

- En un subestudio longitudinal evaluar en una población de pacientes con PTI crónica las modificaciones en la hemostasia como consecuencia del tratamiento recibido (IGIV o AR-TPO).
- Presentación de un caso que avala la importancia de conocer las características de las plaquetas en los pacientes con PTI refractaria con el fin de orientar el abordaje terapéutico de estos pacientes.

## **4.MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.1. Descripción de los pacientes incluidos en el estudio**

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica, CEIC, del Hospital Universitario Los procedimientos se realizaron siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki. Todos los individuos que se incluyeron fueron informados y firmaron el consentimiento de participación. Se garantizó manejar la información respetando legislación española sobre códigos éticos de conducta (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal; Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal; y Ley 8/2001, del 13 de Julio, de Protección de datos de carácter personal en la Comunidad de Madrid).

Se incluyeron 138 pacientes diagnosticados de PTI crónica según los criterios definidos por Rodeghiero (cifra de plaquetas inferior a  $100 \times 10^9/L$  durante un tiempo mayor a 12 meses, con megacariocitos normales o aumentados en médula ósea, sin evidencia de displasia en el estudio de extensión de sangre periférica ni otras patologías que puedan ser las causantes de la trombocitopenia)[44], desde el año 2010 hasta 2016 en la Sección de Trombosis y Hemostasia del Hospital Universitario La Paz. Dieciocho pacientes no precisaron nunca tratamiento para la PTI, y los 120 restantes habían precisado en algún momento tratamiento con IGIV, corticoides, esplenectomía, AR-TPO (romiplostim o eltrombopag), azatioprina, rituximab o dapsona. Ver tablas 4 a7.

En el estudio transversal, se incluyeron 97 pacientes: 58 presentaban trombocitopenia (plaquetas  $<100 \times 10^9/L$ ), 40 no recibían tratamiento (4 de ellos habían sido esplenectomizados y se estudiaron de manera independiente), 22 estaban en



tratamiento con corticoides, 18 con AR-TPO (14 con eltrombopag y 4 con romiplostim) y 17 con IGIV en el momento de extracción de la muestra.

En el estudio longitudinal se compararon las características de las plaquetas de los pacientes antes y después de responder al tratamiento con IGIV o con AR-TPO. En el grupo que recibió tratamiento con IGIV se incluyeron 28 pacientes (85,7% mujeres, edad media 61,5 años, rango 24 -92; Tabla 10).

En el grupo de pacientes tratados con AR-TPO se incluyeron 13 pacientes (57% mujeres, edad media 59,7 años, rango 38-81). En la tabla nº 11 se muestran las características clínicas de los pacientes con anterioridad al tratamiento incluyendo el tipo de agonista, la dosis administrada a cada paciente y el recuento de plaquetas alcanzado. Tres de los pacientes requirieron cambio del agonista empleado en el tratamiento. Dos de los pacientes habían recibido previamente romiplostim que se cambió a eltrombopag, en uno de ellos por depresión grave como efecto adverso (paciente nº6) y en otro por presentar dificultades para ajustar la dosis (paciente nº8). En el tercer paciente (nº 12) se sustituyó eltrombopag por romiplostim por pérdida de respuesta al primero.

También realizamos el seguimiento en el tiempo de un paciente desde antes hasta tres meses después de realizada la esplenectomía.

Como grupo control se incluyeron 87 personas sanas, de edades y distribución por sexo similar al grupo de pacientes incluidos en el estudio. Este grupo se reclutó en la Unidad de Donantes de nuestro hospital.

Para el caso clínico se extrajeron muestras en diversos momentos de la evolución de la trombocitopenia de un paciente refractario a distintas líneas terapéuticas.

## 4.2. Criterios para la inclusión y exclusión de los pacientes en el estudio

### 4.2.1. Criterios de inclusión

- **Pacientes**
  - Pacientes diagnosticados de PTI crónica de acuerdo a las recomendaciones actuales [47, 134, 135].
  - Edad  $\geq 18$  años.
  - Pacientes que habían aceptado participar en el estudio mediante la firma del consentimiento informado.
    - Los pacientes con PTI crónica que participaron en el estudio longitudinal debían tener un recuento de plaquetas  $<30 \times 10^9/L$  en el momento de la extracción de la primera muestra y, en el grupo tratado con AR-TPO,  $<65 \times 10^9/L$  si estaban en tratamiento concomitante con corticoides o IGIV.
- **Controles sanos:**
  - Sujetos con edad  $\geq 18$  años y que habían aceptado participar en el estudio mediante la firma del consentimiento Informado.

### 4.2.2. Criterios de exclusión comunes a pacientes y controles sanos:

- Estar en tratamiento con anticoagulantes o medicamentos que puedan afectar la hemostasia tales como antagonistas de la vitamina K, heparina, antiinflamatorios no esteroideos, anticoagulantes orales de acción directa, anticonceptivos orales y antiagregantes en los diez días previos al estudio.
- Haber sido diagnosticados de trastorno de la coagulación o trombopatía.

- Función renal o hepática alterada.
- Hipertensión arterial no controlada (tensión arterial sistólica  $\geq 140$  mm Hg y/o tensión arterial diastólica  $\geq 90$  mm Hg).
- Hiperlipidemia.
- Enfermedad arterial coronaria o periférica.
- Haber recibido una transfusión de plaquetas en los quince días previos a la extracción.

#### **4.3. Extracción y preparación de las muestras**

Las muestras de sangre se extrajeron a la misma hora en todos los sujetos (entre las 9 y las 10 horas de la mañana) para evitar la influencia de los ciclos circadianos en las variables estudiadas.

A cada paciente se le extrajeron, por venopunción antecubital, 10 mL de sangre total en tubos de plástico de Vacutainer® (*BD, Becton Dickinson and Company, Madrid, Spain*). Siete mL se recogieron en tubos de citrato trisódico tamponado 3,8%, concentración 0,129M, y 3 mL en tubos de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Las muestras en EDTA se emplearon para determinar el recuento de plaquetas y los niveles plasmáticos de TPO y de APRIL.

Las muestras recogidas en citrato se utilizaron para realizar los estudios funcionales tales como la activación plaquetaria, la generación de trombina asociada al plasma y a las MPs y la unión de Anexina V.

El plasma rico en plaquetas (PRP) se obtuvo por la centrifugación de sangre total a 150 x g, durante 20 minutos a 23°C.

Para obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP) las muestras de sangre total se centrifugaron a 2.500 x g, durante 20 minutos a 23°C.

El plasma libre de plaquetas (PFP) se obtuvo sometiendo al PPP a una segunda centrifugación a 13.000 x g durante 2 minutos a 23°C.

Las alícuotas de PPP y PFP se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

Para la obtención de plaquetas lavadas, los dos tercios superiores del PRP se centrifugaron a 650 x g, durante 10 minutos a 23°C después de la adición de una solución de ácido cítrico/dextrosa (citrato de sodio 85 mM, ácido cítrico 65 mM y glucosa 104 mM) en una proporción ACD 1:10. A continuación el sedimento fue resuspendido en un volumen igual de solución tampón HEPES (HEPES 10 mM, NaCl 145 mM, KCl 5 mM y MgSO<sub>4</sub> 1 mM; pH 7,4).

#### **4.4. Análisis de las muestras**

##### **4.4.1. Recuento de plaquetas**

El recuento del número de plaquetas de las muestras de sangre en EDTA se realizó con el Coulter Ac. T Diff cell counter (Beckman Coulter, Madrid, España).

##### **4.4.2. Determinación de los niveles de TPO en plasma**

La concentración plasmática de TPO se determinó en PFP empleando un kit comercial (DuoSet-R&D, Minneapolis, MN, USA) mediante la técnica de ELISA.

#### **4.4.3. Determinación de plaquetas inmaduras o reticuladas**

La determinación de plaquetas reticuladas se realizó siguiendo el método previamente descrito por Hayashi y cols [136]. Las muestras de PRP fueron fijadas con formaldehído al 1% durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente fueron resuspendidas con PBS. A continuación 50  $\mu$ L de la muestra fueron incubados con 5  $\mu$ L de un anticuerpo monoclonal dirigido contra la subunidad  $\alpha$ IIb unido a ficoeritrina (PE) (Biocytex, Marseille, France) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente fueron añadidos 600  $\mu$ L de PBS y 100  $\mu$ L de naranja de tiazol (Retic-COUNT<sup>®</sup>; BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Tras la incubación durante dos horas, en la oscuridad y a temperatura ambiente, las muestras fueron cuantificadas por citometría de flujo.

#### **4.4.4. Determinación de los niveles plasmáticos de APRIL**

Se determinaron los niveles de APRIL en PPP mediante la técnica de ELISA (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*).

#### **4.4.5. Estudio de la activación plaquetaria**

Para evaluar la capacidad de activación del receptor de fibrinógeno, el PRP se diluyó con tampón HEPES a una concentración 1:5. Alícuotas de 50  $\mu$ L se incubaron con buffer (condición basal) o con 100  $\mu$ M de péptido activador del receptor de trombina (TRAP, Bachem, Bubendorf, Suiza) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación se añadió PAC1 (*Becton Dickinson, Madrid, Spain*), un anticuerpo monoclonal (mAb) que reconoce sólo la forma activa del receptor de fibrinógeno, marcado con fluoresceína (FITC). Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente en

la oscuridad, las plaquetas se diluyeron con PBS y se realizó el análisis por citometría de flujo (Becton Dickinson FACScan benchtop flow cytometer, Becton Dickinson).

Para determinar el número de receptores de fibrinógeno existentes en la superficie plaquetaria, el PRP se diluyó 1:5 en buffer PBS y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente en la oscuridad con un anticuerpo monoclonal unido a PE, dirigido contra la subunidad  $\alpha$ IIb (CD41, Biocytex, Marseille, France) o contra la subunidad  $\beta$ 3 del receptor de fibrinógeno (BD Pharmingen). Tras la incubación el PRP se diluyó de nuevo con PBS (1:6) y se analizaron por citometría de flujo.

La expresión de P-selectina se determinó evaluando la unión de un anticuerpo monoclonal anti-P-selectina marcado con FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) que se une a la P-selectina, marcador de degranulación. Se determinó tanto en estado basal como tras la estimulación con TRAP 100  $\mu$ M. La incubación con los anticuerpos se realizó durante 15 min a temperatura ambiente y en la oscuridad.

#### **4.4.6. Presencia de signos de apoptosis en las plaquetas.**

Para medir la exposición de PS en la superficie de las plaquetas se midió la unión a Annexina V marcada con FITC (Becton Dickinson Pharmingen, Madrid, España). Para ello las plaquetas lavadas se resuspendieron en buffer para la unión de Annexina V (10 mM Hepes, 10 mM NaOH, 140 mM NaCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4), se añadió el reactivo Annexin V-FITC y posteriormente las muestras analizaron por citometría de flujo.

#### **4.4.7. Estudio de la capacidad procoagulante del plasma**

La trombina es la molécula clave del mecanismo hemostático, por lo que evaluar su generación es una prueba de la capacidad hemostática de la sangre.

Para medir la generación de trombina se utilizó la trombinografía automática calibrada (CAT, Calibrated Automated Thrombogram, Thrombinoscope). Se trata de un método fluorimétrico que cuantifica la cantidad de trombina que se genera en una muestra de plasma después de la activación de la coagulación.

En este ensayo se añade al plasma a estudio un sustrato fluorogénico específico de la trombina que al ser escindido por ella libera un producto fluorescente. El desarrollo de la fluorescencia en función del tiempo permitirá conocer la cinética de la generación de trombina [137].

Ventajas e inconvenientes de la trombinografía automática calibrada (CAT)	
Ventajas	Inconvenientes
La turbidez de la muestra no afecta los resultados	<p>El test puede verse afectado por numerosos factores:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- el efecto del filtro interno (absorción y emisión de fluorescencia por las propias moléculas que la emiten)</li> <li>- el tiempo de uso de la lámpara emisora de la radiación excitante</li> <li>- la capacidad fluorogénica individual del plasma del paciente</li> <li>- durante la determinación, un 30-40% del sustrato fluorogénico es consumido, pudiendo afectar el cálculo de la concentración de trombina.</li> </ul>
	<p>Para corregir estos factores:</p> <p>El método incluye la medición en paralelo de la generación de trombina en pocillos que contienen la muestra problema y una concentración conocida del complejo alfa<sub>2</sub>-macroglobulina/trombina. Este complejo puede escindir el sustrato fluorogénico, pero no es capaz de actuar sobre ninguno de los sustratos de la trombina.</p>

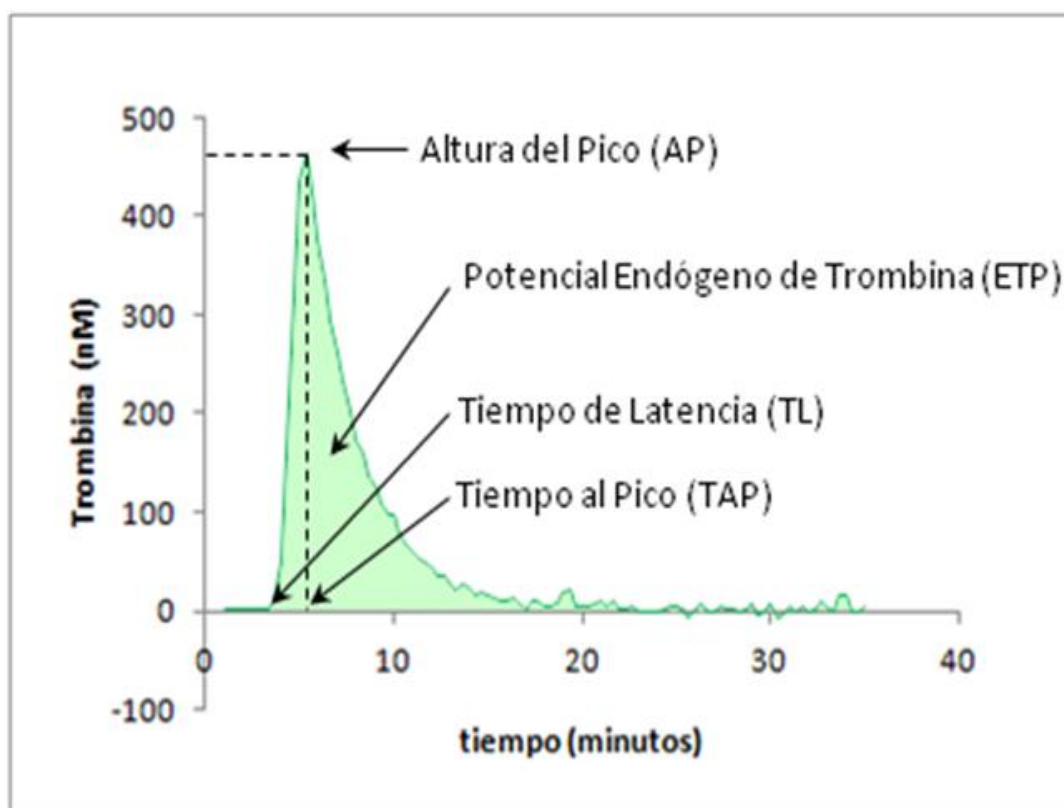
**Tabla 3. Ventajas e inconvenientes de la trombinografía automática calibrada.**

En la figura 13 se muestra a modo de ejemplo un trombograma y los parámetros que se obtienen en el test. El *tiempo de latencia* (TL) es el tiempo requerido para la formación de 10 nM de trombina. El *tiempo al pico* (TAP) es el tiempo requerido para alcanzar la máxima concentración de trombina o la *altura del pico* (AP). El *potencial endógeno de trombina* (ETP) representa la capacidad máxima de generación de trombina de la muestra y es equivalente al área bajo la curva de la concentración de trombina vs. el



tiempo. Todos los parámetros son calculados de forma automática por el programa Thrombinoscope de Thrombinoscope BV (Maastricht, Holanda). El Índice de Velocidad (IV), permite calcular la velocidad con la que se genera la trombina durante el ensayo. Se puede obtener a partir de los datos experimentales mediante la siguiente fórmula:

$$IV = \frac{AP}{TAP - LT}$$



**Figura 13: Ejemplo de gráfico que se obtiene en la Trombinografía Automatizada Calibrada (CAT).** Se representa el *tiempo de latencia* (TL) (minutos) definido por el tiempo que transcurre desde el comienzo del test hasta el momento de la generación de 10 nM de trombina; la *altura del pico* (AP) (nM) definido por la máxima concentración de trombina alcanzada; el *tiempo al pico* (TAP) (minutos) o tiempo que transcurre desde el inicio del test hasta la obtención de la concentración máxima de trombina; y el *potencial endógeno de trombina* (ETP) (nM x minutos) (zona coloreada en verde) que representa la cantidad total de trombina generada durante el transcurso del test.

En nuestros pacientes la capacidad de generación de trombina fue medida en alícuotas de 80 µL de PFP, se añadió 20 µL del reactivo PPP reagent-LOW, (*Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands*), compuesto por FT recombinante (concentración final de 1 pM) y una mezcla de PLs (concentración final de PLs totales de 4 µM), y 20 µL de una solución tampón compuesta por un sustrato específico de la trombina y CaCl<sub>2</sub> (solución

FluCa Kit de *Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands*). La generación de trombina se registró de forma continua con un fluorímetro Fluoroscanner FL (*Thermo Labsystems, Helsinki, Finland*), (excitación a 390 nm y emisión a 460 nm). Los valores de fluorescencia se convirtieron en actividad de trombina en función del tiempo con el programa específico Thrombinoscope (*Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands*), versión 3.6. Todas las muestras se hicieron por triplicado.

#### **4.4.8. Estudio de la capacidad procoagulante asociada a Micropartículas (MPs)**

La actividad procoagulante asociada a los PLs de las MPs se evaluó en PFP el ZYMUPHEN MP-Activity kit (Hyphen BioMed, Neuville sur Oise, France), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El kit empleado es un test funcional para medir la actividad procoagulante de las MPs en plasma humano a través de la generación de trombina. [138, 139].

El PFP con calcio, FXa e inhibidores de la trombina, se introduce en un pocillo de una microplaca recubierto con estreptavidina y Anexina unida a biotina. Los PLs expuestos en la superficie de las MPs presentes en la muestra se unen a la Anexina-V. Posteriormente se añade protrombina que pasa a trombina.

La cantidad de trombina generada será proporcional a la cantidad de PLs contenidos en la muestra. La concentración de PLs es el factor limitante de la reacción, la cual, a su vez, es directamente proporcional a las MPs contenidas en el plasma a estudio.

La trombina generada se une a un sustrato cromogénico, la reacción se para con ácido cítrico al 2% y posteriormente, se mide la absorbancia o liberación de color a 405 nm (A405).

#### **4.4.9. Caracterización del origen celular de las micropartículas**

La cuantificación y determinación del origen de las MPs se realizó en PFP por citometría de flujo siguiendo las recomendaciones de los "*Scientific Subcommittees of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*". Para detectar las MPs fue necesario calibrar el citómetro con microesferas que permitieron establecer la ventana que incluía a las partículas de <1 micra de diámetro. Las MPs se identificaron según su tamaño y su capacidad para unir FITC-Anexina V.

Para identificar el origen celular y la composición de las mismas, se usaron anticuerpos monoclonales contra antígenos específicos de distintos tipos celulares: plaquetas (CD41, Biocytex, Marseille, France), eritrocitos (CD235), monocitos (CD14), células endoteliales (CD31) y leucocitos (CD45), todos ellos marcados con ficoeritrina (BD Biosciences, Madrid, Spain).

#### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados fue realizado por la Unidad de Bioestadística del Hospital Universitario La Paz. El análisis se realizó con el software SPSS versión 17.0 para Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). La normalidad de la distribución de la población se determinó con el test de D'Agostino Pearson.

Los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar o como mediana (percentilo 25-percentilo 75).

La comparación entre dos grupos se realizó con el test de Student o con el de Mann-Whitney. El análisis de tres o más grupos se realizó utilizando un método no

paramétrico, el test de Kruskal-Wallis, y empleando el test post-hoc de Dunn. Para comparar los datos de los pacientes antes y después de los tratamientos se usó el test de Wilcoxon para muestras pareadas.

La existencia de correlación lineal entre los distintos parámetros cuantitativos estudiados se determinó mediante el coeficiente de correlación de Pearson (cuando la población seguía una distribución normal), o con el coeficiente de correlación de Spearman (cuando la distribución de la población no era normal). Los valores de  $P < 0,05$  se consideraron significativos.

## **5.RESULTADOS**

## **Análisis de los resultados**

Presentamos los resultados obtenidos en tres apartados. En primer lugar, realizamos un estudio transversal, determinando las diferentes variables en pacientes respondedores a distintos tratamientos, y los comparamos con un grupo control de pacientes con PTI sin tratamiento y otro de individuos sanos.

En segundo lugar, realizamos un estudio longitudinal tomando muestras de los pacientes antes y después de responder a los distintos tratamientos. En esta situación solo pudimos incluir los datos de pacientes tratados con IGIV o AR-TPO y en ambos casos se compararon con un grupo control sano.

En tercer lugar, presentamos el caso de un paciente de PTI refractario cuya terapia fue ajustada sobre la base de los hallazgos de laboratorio.

### **5.1 ESTUDIO TRANSVERSAL DE LAS PLAQUETAS DE PACIENTES SOMETIDOS A DISTINTOS TRATAMIENTOS**

Determinamos la respuesta de los pacientes a los distintos tratamientos, considerando pacientes con PTI que recibieron tratamiento con IGIV, corticoides, AR-TPO y pacientes que no precisaron tratamiento en el momento del estudio, y comparándolos con un grupo control.

### 5.1.1 Características de los pacientes

Los datos demográficos y los tratamientos de los pacientes se muestran en las tablas 4

a 7:

Nº	Edad (años)	Género	Tiempo desde el diagnóstico (años)	Tratamientos previos	Tratamientos concomitantes	Número de plaquetas ( $\times 10^9/L$ )
1	18	M	0.5	Corticoides, IGIV	NO	119
2	70	F	6.8	Corticoides, IGIV, esplenectomía	Nifedipino, captopril, amiloride/htz, omeprazol, metformina, glicazida	36
3	82	F	4.0	Corticoides, IGIV	Bromazepam, esomeprazol, simvastatina	145
4	77	M	3.5	Corticoides, IGIV	antiHTA	205
5	79	F	3.5	Corticoides, IGIV	Enalapril, anastrozol	73
6	76	F	0.6	Corticoides, IGIV	Carvedilol, losartan, tramadol, paracetamol, rabeprazol, nitroglicerina	167
7	27	F	0.6	Corticoides, IGIV	NO	68
8	63	F	0.7	Corticoides, IGIV	Folinato cálcico, calcio, vitamina D, paracetamol, codeína	28
9	81	F	9.1	Corticoides, IGIV, azatioprina	Enalapril, verapamilo, lovastatina, salbutamol, levotiroxina, omeprazol, budesónida	16
10	86	F	0.7	Corticoides, IGIV	Omeprazol, levotiroxina, carbamacepina, amlodipino, trimetazidina, pravastatina	115
11	74	F	6.3	Corticoides, IGIV	Simvastatina, aliskiren, candesartan, htz	166
12	40	F	1.0	Corticoides, IGIV	NO	138
13	38	M	22.0	Corticoides, IGIV, azatioprina	NO	9

14	52	F	2.3	Corticoides, IGIV	NO	308
15	83	F	2.0	Corticoides, IGIV	Digoxina, indapamida	41
16	58	F	0.8	Corticoides, IGIV	Antidiabéticos orales	58
17	65	F	2.0	Corticoides, IGIV	Levotiroxina, alendronato, flurazepam	65
18	26	F	3.8	Corticoides, IGIV	NO	50
19	41	F	13.2	Corticoides, IGIV	Nicardipino	88
20	33	F	7.0	Corticoides, IGIV	NO	619
21	81	M	1.1	Corticoides, IGIV	Enalapril	15
22	40	F	6.2	Corticoides, IGIV	Sibutramina	55

**Tabla 4. Características clínicas y demográficas de los pacientes tratados con corticoides**



Nº	Edad (años)	Género	Tiempo desde el diagnóstico (años)	Tratamientos previos	Tratamientos concomitantes	Número de plaquetas ( $\times 10^9/L$ )
1	24	F	7.1	Corticoides, IGIV	Hierro	106
2	92	F	3.1	Corticoides, IGIV	Nitroglicerina, torasemida, carvedilol	24
3	53	F	17.3	Corticoides, IGIV	NO	22
4	51	F	11.1	Corticoides, IGIV	Alprazolam	158
5	75	M	20.0	NO en los 2 años previos	Domperidona, omeprazol, clonazepam, fludrocortisona,	29
6	77	F	12.2	Corticoides, IGIV	Indapamida, metimazol	33
7	46	F	15.5	Corticoides, IGIV	NO	26
8	79	F	1.3	Corticoides, IGIV, romiplostin	Amiloride/htz, escitalopram, paracetamol, omeprazol, tramadol, olmesartan, amitriptilina, salmeterol/fluticasona	145
9	43	F	1.6	Corticoides, IGIV	Levotiroxina	105
10	39	F	5.1	Corticoides, IGIV, rituximab	Levotiroxina	56
11	83	F	11.3	IGIV	Espironolactona, isosorbida	67
12	75	F	2.1	NO	Enalapril, ezetimiba	76
13	38	F	10.3	Metotrexate	NO	135
14	52	F	31.0	Corticoides, IGIV, azatioprina, rituximab	NO	60
15	79	M	29.0	Corticoides, IGIV, inmunosupresores	NO	89
16	33	F	19.0	Corticoides, IGIV	NO	102
17	81	M	1.1	Corticoides, IGIV	Enalapril	167

**Tabla 5. Características clínicas y demográficas de los pacientes tratados con IGIV**

Nº	Edad (años)	Género	Tiempo desde el diagnóstico (años)	Tratamiento	Tratamientos previos	Tratamientos concomitantes	Número de plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)
1	80	M	12.5	Revolade 25 mg/día	Corticoides, IGIV	Anastrozol, enalapril	120
2	39	F	11.1	Revolade 50 mg/día	Corticoides, IGIV	NO	39
3	80	F	1.9	Romiplostin 3 mcg/Kg	Corticoides, IGIV	Amiloride/htz, escitalopram, paracetamol, omeprazol, tramadol, olmesartan, amitriptilina, salmeterol/fluticasona	57
4	73	F	7.0	Romiplostin 8 mcg/Kg	Corticoides, IGIV	NO	42
5	38	M	22.0	Revolade 25 mg/día	Corticoides, IGIV, esplenectomía, azatioprina	NO	34
6	41	M	4.1	Revolade 50 mg/día	Corticoides, IGIV, rituximab	NO	205
7	29	F	4.2	Revolade 50 mg/día	Corticoides, IGIV	NO	216
8	82	F	36.0	Romiplostin 8 mcg/Kg	Corticoides, IGIV, revolade (suspendido por toxicidad hepática)	Omeprazol, candesartan, atorvastatina	69
9	29	F	4.2	Revolade 50 mg/día	Corticoides, IGIV	NO	217
10	60	F	23	Revolade 59 mg/día	Corticoides, IGIV	NO	69
11	74	F	2.7	Romiplostin 2 mcg/Kg	Corticoides, IGIV, revolade (suspendido por toxicidad hepática)	Simvastatina, alopurinol, omeprazol, metformina	116
12	72	M	10.1	Revolade 50 mg/día	Corticoides, IGIV	Atenolol, omeprazol	119
13	51	F	3.0	Revolade 25 mg/día	Corticoides, IGIV	NO	77
14	78	M	28.0	Revolade 50 mg/día	Corticoides, IGIV	Atorvastatina, ramipril/htz, finasteride	112

15	79	M	1.3	Revolade 75 mg/día	Corticoides, IGIV	Metformina, vildagliptina	79
16	78	F	12.1	Revolade 25 mg/día	Corticoides, IGIV, rituximab, romiplostin (por 2 años hasta pérdida de respuesta)	Bromazepam, omeprazol, citalopra,	260
17	44	F	1.1	Revolade 25 mg/día	Corticoides, IGIV	NO	144
18	63	M	13.2	Revolade 75 mg/día	Corticoides, IGIV, esplenectomía	Simvastatina, alopurinol, omeprazol, metformina	376

**Tabla 6. Características clínicas y demográficas de los pacientes tratados con AR-TPO**

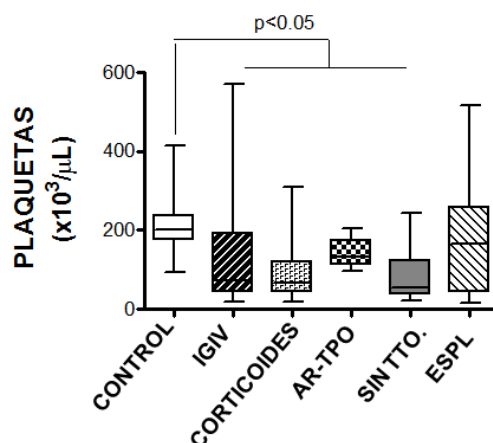
Nº	Edad (años)	Género	Tiempo desde el diagnóstico (años)	Tratamientos previos	Tratamientos concomitantes	Número de plaquetas ( $\times 10^9/L$ )
1	23	F	1.6	IGIV	NO	41
2	24	F	7.3	Corticoides, IGIV	Hierro	33
3	18	M	0.8	Corticoides, IGIV	NO	116
4	92	F	3.0	Corticoides, IGIV	Carvedilol	45
5	49	F	3.2	NO	NO	54
6	55	F	17.6	Corticoides, IGIV	NO	17
7	80	F	2.2	Corticoides, IGIV	Rabeprazol, carvedilol, tramadol, paracetamol, simvastatina, glicazida, candesartan, terrazepam, carbonato cálcico, calcitriol, bifosfonatos, hierro	123
8	67	F	4.3	Corticoides, IGIV	NO	180
9	69	M	3.6	NO	NO	22
10	75	F	1.2	NO	Htz, irbesartan	38
11	45	F	3.1	NO	NO	158
12	61	F	17.3	Corticoides, IGIV	Complejo vitamínico, ranitidina	49
13	56	F	7.3	NO	NO	53
14	62	M	2.5	Corticoides, IGIV	NO	170
15	67	M	2.3	NO	NO	47
16	84	M	5.6	NO	NO	130
17	55	M	8.1	NO	NO	175

18	54	F	17.5	Corticoides, IGIV	NO	22
19	85	F	18	Corticoides, IGIV	NO	68
20	46	F	15.5	Corticoides, IGIV	NO	20
21	46	F	14.0	Corticoides, IGIV	NO	79
22	23	M	14.7	Corticoides, IGIV	NO	28
23	21	M	1.3	Corticoides, IGIV	NO	51
24	69	F	16.4	NO	Rifaximina, levotiroxina, verapamilo, bromazepam, levocetirizina, atorvastatina, trimetazidina, olmesartan, clortalidona, vitamina B1/B6/B12, alendronato, beclometasona, montelukast	32
25	76	F	21.0	NO	NO	37
26	75	F	1.0	NO	Enalapril, ezetimiba	53
27	26	F	4.1	NO	NO	53
28	40	F	15.9	Corticoides, IGIV	NO	243
29	40	F	1.5	NO	NO	139
30	44	F	2.1	NO	NO	89
31	46	F	1.8	Corticoides, IGIV	NO	33
32	42	F	1.2	NO	NO	33
33	35	F	5.3	Corticoides, IGIV	NO	66
34	36	F	0.7	Corticoides	NO	107
35	25	F	4.6	Corticoides	Propanolol	50
36	79	M	24.8	Inmunosupresores	NO	109
37	49	M	1.6	NO	NO	95
38	54	F	1.0	NO	NO	68
39	40	F	1.3	Corticoides, azatioprina	Diazepam, clonazepam	146
40	35	F	8.7	NO	NO	149

**Tabla 7. Características clínicas y demográficas de los pacientes sin tratamiento para la PTI en el momento del estudio**

### 5.1.2 Recuento de plaquetas en distintos grupos

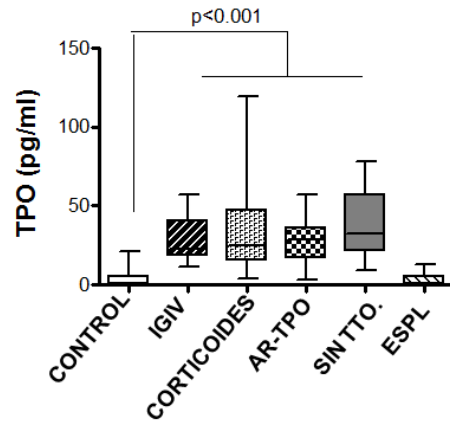
Como se observa en la figura 14, sólo los pacientes con PTI esplenectomizados recuperaron un número normal de plaquetas, mientras que los tratados con otras terapias o sin necesidad de tratamiento tenían un número de plaquetas que era significativamente menor que la cifra de plaquetas del grupo control.



**Figura 14. Recuento de plaquetas en los distintos grupos sometidos a estudio.** La comparación entre grupos se realizó por Kruskal-Wallis y se usó el test a posteriori de Dunn.

### 5.1.3 Estudio de los niveles de trombopoyetina en los pacientes sometidos a distintos tratamientos.

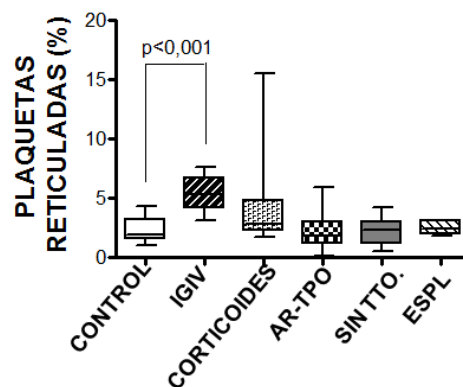
Con el objetivo de analizar el mecanismo de regulación de la producción de plaquetas por TPO, se determinaron los niveles de esta hormona en los distintos grupos. Los niveles plasmáticos de TPO en todos los distintos grupos se muestran en la Fig. 15. Sólo los pacientes esplenectomizados tienen niveles plasmáticos similares al grupo control. En el resto de los pacientes con diagnóstico de PTI, tanto los que recibieron tratamiento como los que no, mostraron niveles más altos que los controles, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.



**Figura 15. Niveles plasmáticos de TPO en los distintos grupos sometidos a estudio determinados por ELISA.** La comparación entre grupos se realizó por Kruskal-Wallis y se usó el test a posteriori de Dunn.

#### 5.1.4 Estudio del número de plaquetas inmaduras en los distintos grupos

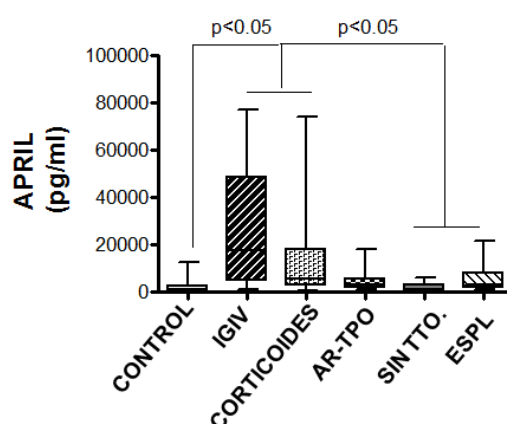
Las plaquetas inmaduras o reticuladas nos indican la capacidad de producción de plaquetas a nivel medular. Como se observa en la figura 16, excepto en el grupo que recibió IGIV, el número de plaquetas reticuladas en los pacientes diagnosticados de PTI en tratamiento o no, fueron similares a las del grupo control.



**Figura 16. Porcentaje de plaquetas reticuladas en los distintos grupos sometidos a estudio determinado por citometría de flujo.** La comparación entre grupos se realizó por Kruskal-Wallis y se usó el test a posteriori de Dunn.

### 5.1.5 Estudio de los niveles plasmáticos de APRIL

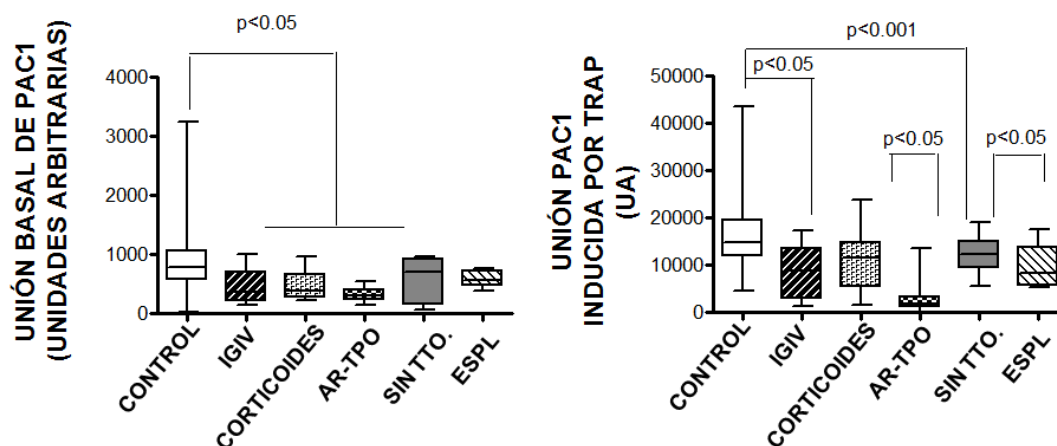
Se determinaron los niveles de APRIL (ligando estimulante de los linfocitos B y de la producción de anticuerpos) en los distintos grupos. Los niveles de APRIL fueron superiores en los pacientes con PTI en los grupos que recibieron IGIV y corticoides respecto al grupo control.



**Figura 17. Niveles plasmáticos de APRIL en los distintos grupos sometidos a estudio determinado por ELISA.** La comparación entre grupos se realizó por Kruskal-Wallis y se usó el test a posteriori de Dunn.

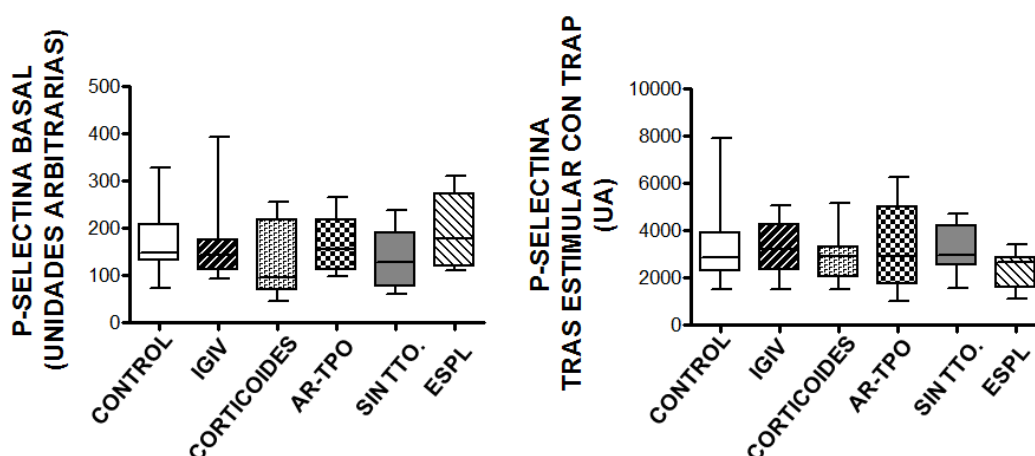
### 5.1.6 Estudio de la funcionalidad plaquetaria

Para estudiar la capacidad de activación de las plaquetas se evaluó la capacidad del receptor del fibrinógeno para unir PAC-1, anticuerpo que reconoce la conformación activa del receptor de fibrinógeno, tras activación con TRAP. Las plaquetas de todos los pacientes con PTI excepto de aquellos esplenectomizados, unieron menos PAC1 en estado basal y tras la activación con TRAP, indicando una menor capacidad de activación del receptor de fibrinógeno (Fig. 18)



**Figura 18. Unión de PAC1 a la superficie de las plaquetas.** Las plaquetas de los individuos de los distintos grupos en estudio se mantuvieron en condiciones basales (panel de la izquierda) o se estimularon con TRAP (100  $\mu$ M, panel de la derecha). La unión de PAC1 se determinó por citometría de flujo. La comparación entre grupos se realizó por Kruskal-Wallis y se usó el test a posteriori de Dunn.

Se evaluó la exposición de P-selectina (utilizado como marcador para determinar la activación plaquetaria y la capacidad de liberación de sus gránulos) en situación basal y tras ser estimuladas con TRAP. Observamos que la capacidad de liberación de los gránulos en todos los pacientes fue similar a la del grupo control (Fig. 19).

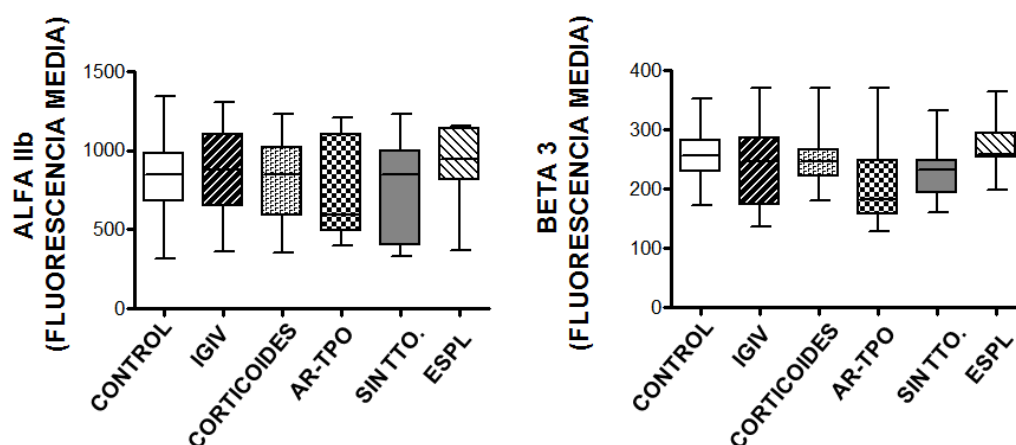


**Figura 19. Expresión de P-selectina en la superficie de las plaquetas.** Las plaquetas de los individuos de los distintos grupos en estudio se mantuvieron en condiciones basales (panel de la izquierda) o se estimularon con TRAP (100  $\mu$ M, panel de la derecha). La unión de un anticuerpo específico contra la P-selectina se evaluó por citometría de flujo. La comparación entre grupos se realizó por Kruskal-Wallis y se usó el test a posteriori de Dunn.



### 5.1.7 Expresión del receptor del fibrinógeno en la superficie de las plaquetas

Para determinar si la disminución en la capacidad de activación de las plaquetas se debía a un déficit en los receptores de fibrinógeno en su superficie, se determinó la expresión de este receptor en los diferentes grupos. Para ello evaluamos la expresión de las subunidades alfa2b y beta3 que conforman el receptor del fibrinógeno en las plaquetas y no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de estos receptores en los pacientes respecto del grupo control. Esto indica que la menor activación de las plaquetas de los pacientes con PTI no se debió a un déficit en la expresión de este receptor.

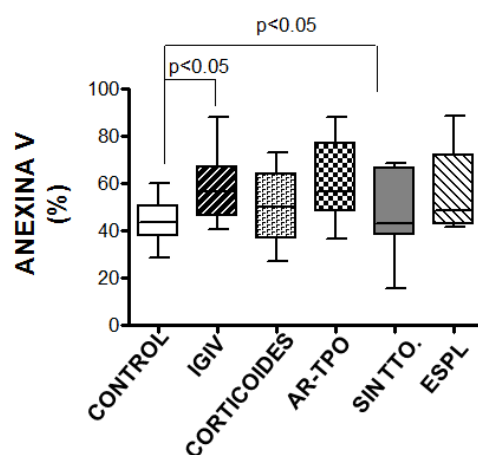


**Figura 20. Expresión del receptor del fibrinógeno en la superficie de las plaquetas.** Las plaquetas de los individuos de los distintos grupos en estudio se incubaron con anticuerpos específicos contra la subunidad alfaIIb (panel de la izquierda) o beta3 (panel de la derecha). La unión de los anticuerpos se determinó por citometría de flujo. La comparación entre grupos se realizó por Kruskal-Wallis y se usó el test a posteriori de Dunn.

### 5.1.8 Apoptosis de las plaquetas de los pacientes con PTI sometidos a distintos tratamientos

La exposición de PS en la superficie de las plaquetas se considera una manifestación de activación o apoptosis celular.

La Fig. 21 muestra que los pacientes con PTI tratados con IGIV y AR-TPO exponían más PS en condiciones basales que los controles sanos. Dado que la activación en las plaquetas de los pacientes está disminuída, el aumento de PS sugiere una apoptosis aumentada en esas plaquetas.



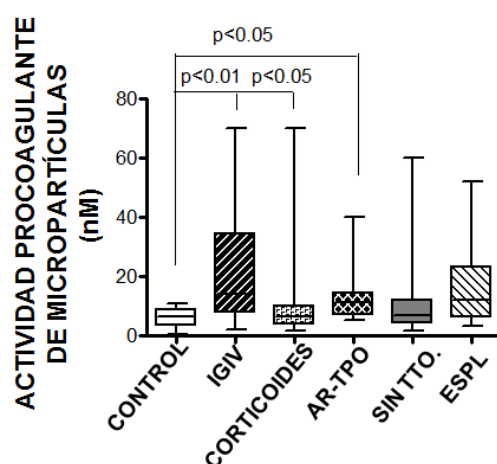
**Figura 21. Exposición de PS en la superficie de las plaquetas.** Las plaquetas de los individuos de los distintos grupos en estudio se incubaron con Anexina V y se analizaron por citometría de flujo. La comparación entre grupos se realizó por Kruskal-Wallis y se usó el test a posteriori de Dunn.

### 5.1.9 Evaluación de la capacidad trombogénica de las plaquetas asociada a micropartículas

Existen referencias que indican que los pacientes diagnosticados de PTI, tienen un riesgo trombótico mayor que la población general[72]. Con el objetivo de determinar el origen

de este fenómeno, decidimos estudiar la capacidad procoagulante de las MPs circulantes en el plasma en estos pacientes.

Como vemos en la figura 22, las plaquetas de todos los pacientes con PTI tenían mayor capacidad trombogénica asociada a MPs que el grupo control, alcanzando diferencias estadísticamente significativas respecto al resto en los pacientes tratados con IGIV, AR-TPO o esplenectomizados.



**Figura 22. Actividad procoagulante debida a micropartículas.** El PFP preparado según se indica en “Métodos” se ensaya con el kit de Zymuphen que evalúa la capacidad procoagulante asociada a la fosfatidilserina de las micropartículas. La comparación entre grupos se realizó por Kruskal-Wallis y se usó el test a posteriori de Dunn.

En el grupo de pacientes esplenectomizados estudiamos el origen celular de las MPs. La Tabla 8 muestra que todos los pacientes menos uno (paciente 3) habían recuperado el número de plaquetas. En tres de los pacientes (pacientes 2, 3 y 4) se observó un número muy elevado de MPs totales a pesar del tiempo transcurrido desde la esplenectomía (realizadas en 1988 y 2007 respectivamente) que eran fundamentalmente de origen plaquetario.

Datos MPs en varios casos de PTI con esplenectomía

	Controles Mean $\pm$ SD (n=5)	Paciente 1 (2004)	Paciente 2 (1988)	Paciente 3 (2007)	Paciente 4 (2009)
Nº plaquetas (x103/ $\mu$ l)	212 $\pm$ 40	243	136	22	308
MP-Activity (nM)	2,84 $\pm$ 1,26	7	12	7,2	6
Plaquetas MPs ( n° AnnexV-CD41+ / $\mu$ l plasma)	148 $\pm$ 58	135	273	728	347
Monocitos MPs ( n° AnnexV-CD14+ / $\mu$ l plasma)	115 $\pm$ 37	53	164	363	81
Endotelio MPs ( n° AnnexV-CD144+ / $\mu$ l plasma)	146 $\pm$ 34	124	144	997	211
Eritrocitos MPs ( n° AnnexV-CD235a+ / $\mu$ l plasma)	135 $\pm$ 17	99	153	2000	193
Leucocitos MPs ( n° AnnexV-CD45+ / $\mu$ l plasma)	30 $\pm$ 7	32	45	451	52
MPs n° AnnexV+ / $\mu$ l plasma	3923 $\pm$ 650	2648	10401	16743	5793

Tabla 8. Diferenciación del origen de MPs en los pacientes esplenectomizados

En uno de los pacientes con PTI esplenectomizados se realizó el seguimiento desde antes hasta tres meses tras esplenectomía. En este caso observamos un aumento en la cifra de MPs de origen plaquetario.

Las MPs de origen endotelial y las derivadas de los monocitos también alcanzaron niveles más altos a los tres meses esplenectomía respecto a los niveles pre-esplenectomía, fluctuando a lo largo del tiempo.

Las MPs de origen eritroide mantuvieron cifras similares pre-esplenectomía y tres meses después.

Se observó una disminución en la cifra de MPs de origen leucocitario.

Datos MPs a lo largo del tiempo en una esplenectomía en PTI

	Controles Mean $\pm$ SD (n=5)	Antes	IgG (1 día)	Post 24h	Post 1/2m	Post 1m	Post 2m	Post 3m
Nº plaquetas (x103/ $\mu$ l)	212 $\pm$ 40	14	42	226	516	258	166	53
MP-Activity (nM)	2,84 $\pm$ 1,26	3,4	23,2	12	5,2	52	16,4	24,6
Plaquetas MPs ( n° AnnexV-CD41+ / $\mu$ l plasma)	148 $\pm$ 58	115	383	215	111	928	317	431
Monocitos MPs ( n° AnnexV-CD14+ / $\mu$ l plasma)	115 $\pm$ 37	66	172	78	25	163	298	275
Endotelio MPs ( n° AnnexV-CD144+ / $\mu$ l plasma)	146 $\pm$ 34	161	138	240	52	185	114	69
Eritrocitos MPs ( n° AnnexV-CD235a+ / $\mu$ l plasma)	135 $\pm$ 17	142	256	117	204	288	117	138
Leucocitos MPs ( n° AnnexV-CD45+ / $\mu$ l plasma)	30 $\pm$ 7	74	37	26	6	67	33	8
MPs n° AnnexV+ / $\mu$ l plasma	3923 $\pm$ 650	3754	3905	3469	1592	5129	3415	4221

Tabla 9. Seguimiento del recuento de MPs en una paciente esplenectomizada

Por otra parte, también observamos que cuando bajaba el número de plaquetas, aumentaba el número MPs de origen plaquetario.

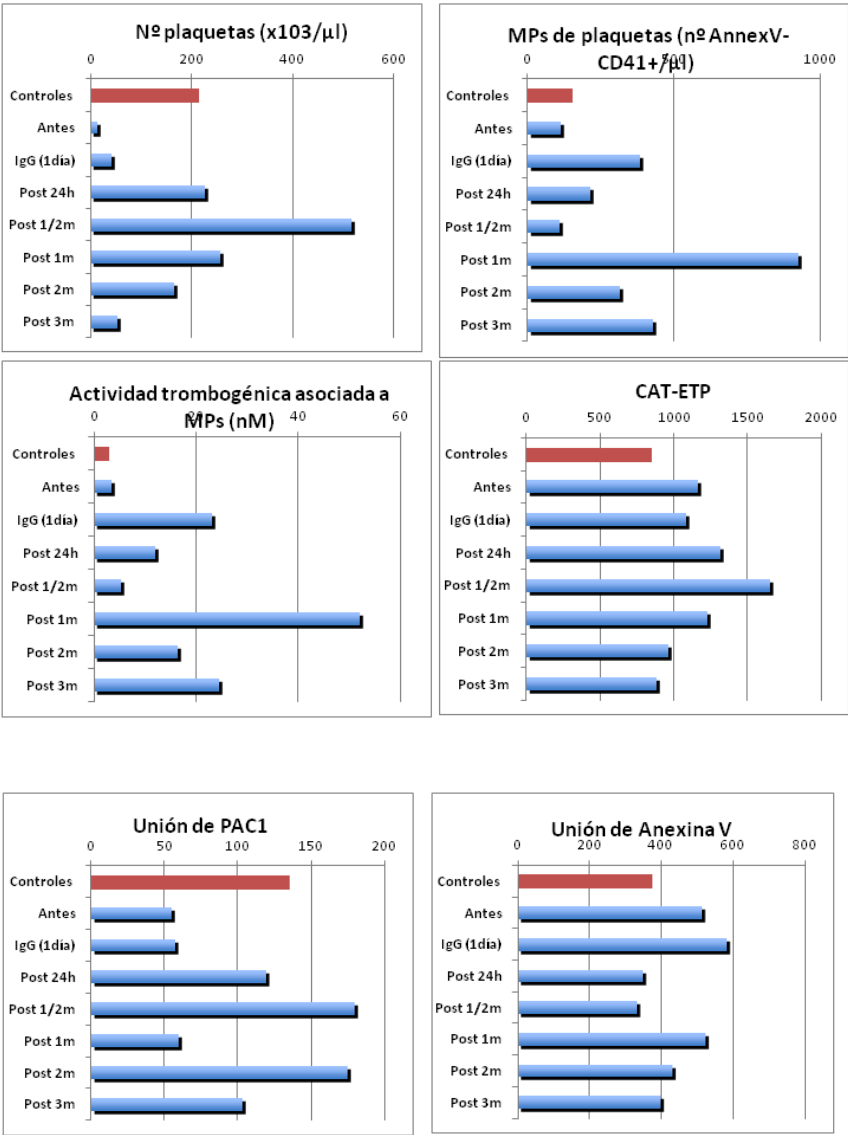
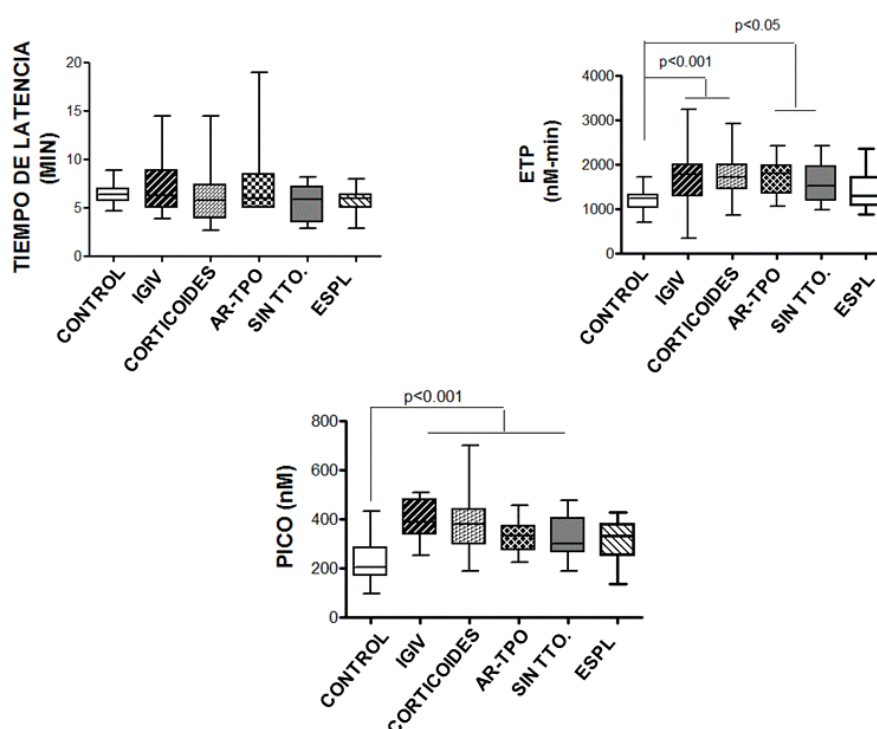


Figura 23. Evolución de la Hemostasia en una paciente esplenectomizada

### 5.1.10 Estudio de la actividad procoagulante del plasma

Se estudió la generación de trombina en el plasma de los pacientes de PTI tratados con los distintos fármacos. No encontramos diferencias entre los distintos grupos en el tiempo de latencia, ni en el tiempo al pico, pero sí un aumento en el ETP y en la altura del pico en todos los pacientes respecto de las muestras de los controles sanos.



**Figura 24. Test de generación de trombina.** Valores obtenidos en la Trombinografía Automática Calibrada (CAT) en los pacientes con PTI tratados con diferentes fármacos o sin tratar y en controles sanos. La comparación entre grupos se realizó por Kruskal-Wallis y se usó el test a posteriori de Dunn.

## 5.2 ESTUDIO LONGITUDINAL

Llevamos a cabo un estudio longitudinal observando las características de las plaquetas de los pacientes diagnosticados de PTI antes y después de recibir tratamiento con IGIV o con AR-TPO, comparándolos con el grupo control.

### 5.2.1 Características de los pacientes

Nº	Edad (años)	Género	Tiempo desde el diagnóstico (años)	Tratamiento previo	Tratamientos concomitantes	Número de plaquetas al inicio del tratamiento ( $\times 10^9/L$ )	Número de plaquetas tras respuesta a IGIV ( $\times 10^9/L$ )
1	24	F	7.3	Corticoides, IGIV	Hierro	33	106
2	92	F	3.0	Corticoides, IGIV	Nitroglicerina, torasemida, candesartan	46	79
3	53	F	16.1	Corticoides, IGIV	NO	16	22
4	70	F	6.4	Corticoides, IGIV	Captopril, nifedipino, amilorida/htz, metformina, glicazida, omeprazol	18	158
5	51	F	11.4	Corticoides, IGIV	Alprazolam	15	23
6	74	M	11.6	NO	Omeprazol, domperidona, clonazepam, fludrocortisona	18	59
7	52	F	14.3	Corticoides, IGIV	NO	1	53
8	82	F	4.2	Corticoides, IGIV	Bromazepam, esomeprazol, simvastatina	66	187
9	77	M	3.5	Corticoides, IGIV	antiHTA	17	205
10	54	F	6.6	Corticoides, IGIV	NO	22	88
11	77	F	11.9	Corticoides, IGIV	Indapamida, metimazol	15	28

12	79	F	10.5	Corticoides, IGIV	Tamoxifeno	45	143
13	46	F	14.7	Corticoides, IGIV	NO	20	94
14	39	F	8.1	Corticoides, IGIV	NO	32	118
15	89	F	1.3	Corticoides, IGIV	Amilorida/htz, escitalopram, paracetamol, omeprazol, tramadol, olmesartan, amitriptilina, salmeterol	1	194
16	43	F	2.0	Corticoides, IGIV	Levotiroxina	2	133
17	39	F	4	Corticoides, IGIV	Levotiroxina, omeprazol	3	67
18	83	F	12.6	Corticoides, IGIV	Espironolactona isosorbida	7	67
19	37	F	9.4	Corticoides, IGIV	NO	1	43
20	73	F	7.00	Corticoides, IGIV	NO	17	91
21	81	M	8.9	Corticoides, IGIV	Enalapril, verapamilo, lovastatina, salbutamol, levotiroxina, omeprazol, budesónida	16	105
22	38	F	25.00	Corticoides, IGIV	NO	1	110
23	65	F	2.1	Corticoides, IGIV	Levotiroxina, atorvastatina,	59	121
24	83	F	2.0	Corticoides, IGIV	Digoxina, indapamida	41	126
25	65	F	2.0	Corticoides, IGIV	Levotiroxina, flurazepam, alendronato	43	81
26	41	F	2.4	Corticoides, IGIV	Nicardipino	35	88
27	33	F	1.9	Corticoides, IGIV	NO	14	47
28	81	M	1	Corticoides, IGIV	Enalapril	1	159

**Tabla 10. Características clínicas y demográficas de los pacientes tratados con IGIV (antes y después de responder al tratamiento)**



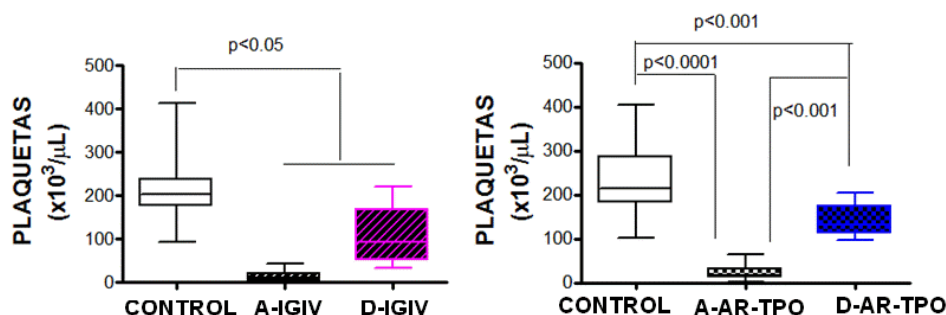
Nº	Edad (años)	Género	Tiempo desde el diagnóstico (años)	Tratamiento previo	AR TPO (E, R) dosis inicial	AR TPO (E, R) dosis al momento de la toma	Tiempo de respuesta (semanas)	Tratamiento concomitante	Número de plaquetas al inicio del tratamiento ( $\times 10^9/L$ )	Número de plaquetas tras respuesta a AR TPO ( $\times 10^9/L$ )
1	81	F	11	Corticoides, IGIV, azatioprina	E 25 mg/d	E 25 mg/d	1	Corticoides	43	158
2	43	F	3.3	Corticoides, IGIV	E 50 mg/d	E 25 mg/d	1	IGIV	64	190
3	38	M	35	Corticoides, IGIV, azatioprina, esplenectomía	E 50 mg/d	E 50 mg/d	7	IGIV	11	120
4	79	F	24	Corticoides, IGIV	E 50 mg/d	E 50 mg/d	1	-	14	118
5	72	M	19	Corticoides, IGIV	E 50 mg/d	E 25 mg/48 horas	9	-	2	97
6	73	F	6.5	Corticoides, IGIV, rituximab, romiplostim	E 50 mg/d	E 75 mg/d	2	-	28	133
7	39	F	5.5	Corticoides, IGIV	E 50 mg/d	E 75 mg/d	7	-	23	100
8	80	F	3.3	Corticoides, IGIV, romiplostim	E 50 mg/d	E 50 mg/d	5	IGIV	7	187
9	52	F	15.5	Corticoides, IGIV	E 50 mg/d	-	4	IGIV	16	105
10	70	M	8.8	Corticoides, IGIV, dapsona, esplenectomía	E 50 mg/d	E 25 mg/d	4	-	29	132
11	77	M	4.5	Corticoides, IGIV	E 50 mg/d	E 25 mg/d	3	IGIV	14	159
12	81	M	2.5	Corticoides, IGIV, eltrombopag	R 3 mcg/Kg/sem	R 3 mcg/Kg/se m	9	IGIV	15	205
13	42	M	3.5	Corticoides, IGIV, rituximab	E 50 mg/d	E 25 mg/d	1	-	27	123

**Tabla 11. Características clínicas y demográficas de los pacientes tratados con AR-TPO (antes y después de responder al tratamiento). E: eltrombopag,**

R: romiplostim

### 5.2.2 Recuento de plaquetas en los distintos grupos

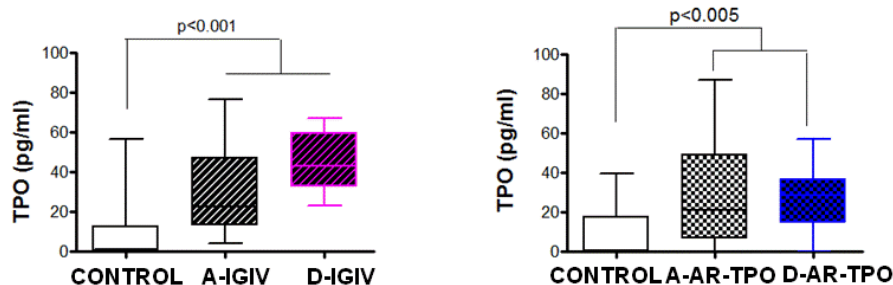
Como se observa en la figura 25, los pacientes con PTI que respondieron a IGIV y a AR-TPO recuperaron el número de plaquetas sin alcanzar los niveles del grupo control.



**Figura 25. Recuento de plaquetas en los distintos grupos.** Se usó el test de Wilcoxon para muestras pareadas para comparar los datos de los pacientes con PTI antes y después de los tratamientos.

### 5.2.3 Evaluación de los niveles de TPO en los pacientes antes y después de recibir tratamiento.

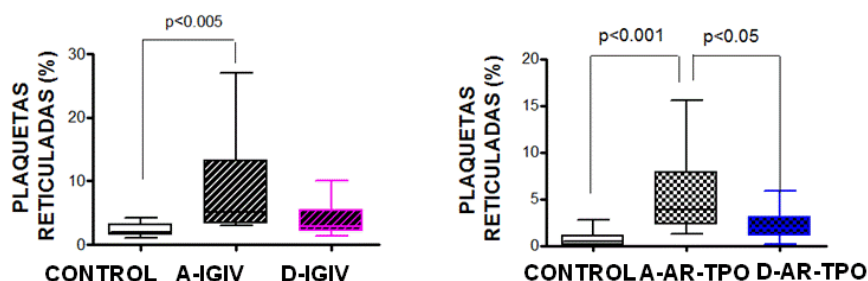
Con el fin de valorar la funcionalidad del mecanismo de regulación de la producción de plaquetas por TPO, se determinaron los niveles de ésta en los distintos grupos antes y después de recibir tratamiento. Los niveles plasmáticos de TPO en los pacientes tanto antes como después de recibir tratamiento con IGIV o con AR-TPO fueron más altos que en los controles.



**Figura 26. Niveles plasmáticos de TPO en los distintos grupos sometidos a estudio determinados por ELISA.** Se usó el test de Wilcoxon para muestras pareadas para comparar los datos de los pacientes con PTI antes y después de los tratamientos.

#### 5.2.4 Estudio del número de plaquetas inmaduras en los distintos grupos antes y después de responder a tratamiento

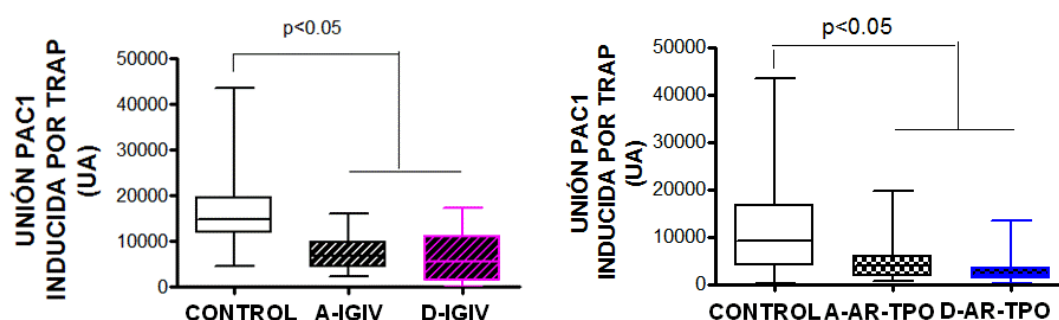
El número de plaquetas reticuladas en los pacientes diagnosticados de PTI antes de responder a los tratamientos fueron significativamente más altos que en los controles. Los pacientes tratados con los AR-TPO, incluso después de recibir tratamiento, siguieron presentando unos niveles de plaquetas reticuladas significativamente más altos que el grupo control (Fig. 27).



**Figura 27. Porcentaje de plaquetas reticuladas.** Se determinaron los niveles de plaquetas inmaduras antes y después de responder a los tratamientos (IGIV o AR-TPO) por citometría de flujo. Se usó el test de Wilcoxon para muestras pareadas para comparar los datos de los pacientes con PTI antes y después de los tratamientos.

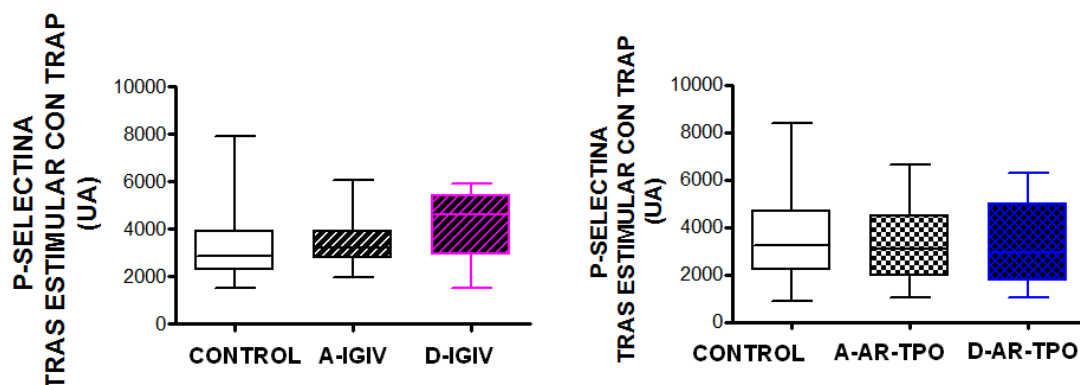
### 5.2.5 Estudio de la capacidad de activación de las plaquetas antes y después de responder a los tratamientos terapéuticos

A pesar de la recuperación en el número de plaquetas tras el tratamiento con IGIV o con AR-TPO, la capacidad de activación de las mismas con TRAP fue menor que la de los controles (Fig. 28)



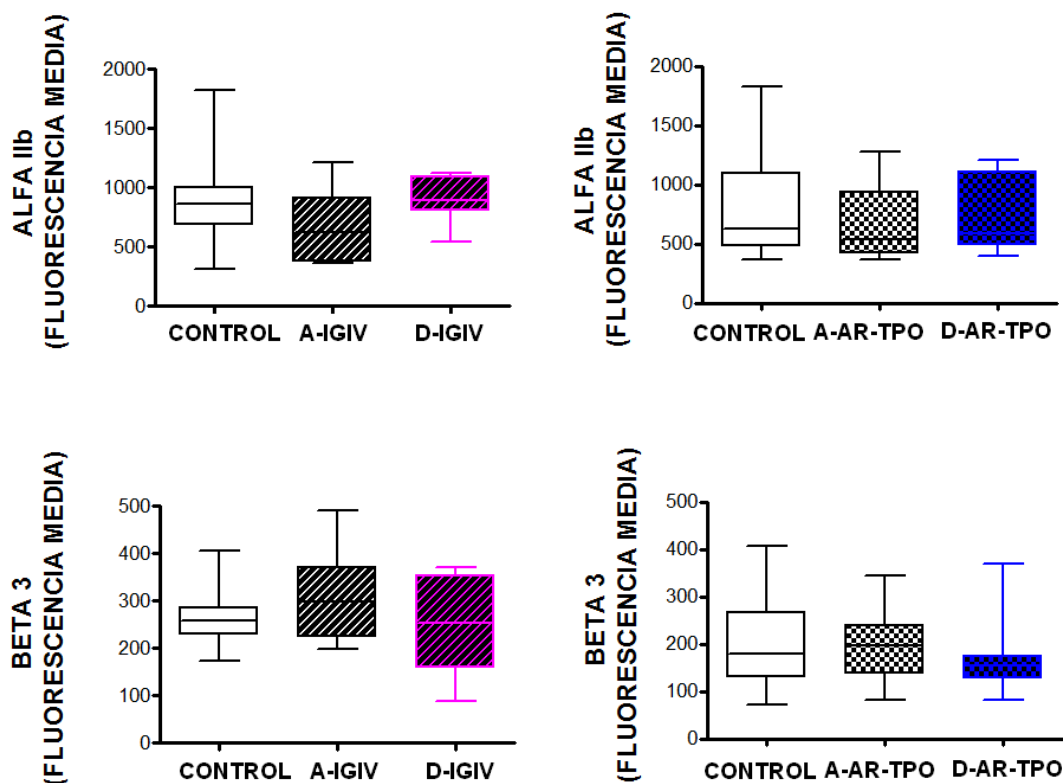
**Figura 28. Unión de PAC1 a la superficie de las plaquetas.** Se determinó por citometría de flujo, la unión de PAC1 a las plaquetas estimuladas con TRAP (100  $\mu$ M) antes y después de responder a los tratamientos (IGIV o AR-TPO). Se usó el test de Wilcoxon para muestras pareadas para comparar los datos de los pacientes con PTI antes y después de los tratamientos.

Al evaluar la exposición de P-selectina en situación basal y tras ser estimuladas con TRAP se observó que la capacidad de liberación de los gránulos en los pacientes antes y después de recibir los tratamientos es adecuada en ambos grupos y similar al grupo control.



**Figura 29. Expresión de P- selectina en la superficie de las plaquetas.** La unión de un anticuerpo específico de flujo contra la P-selectina a las plaquetas estimuladas con TRAP (100  $\mu$ M) antes y después de responder a los tratamientos (IGIV o AR-TPO) se determinó por citometría. Se usó el test de Wilcoxon para muestras pareadas para comparar los datos de los pacientes con PTI antes y después de los tratamientos.

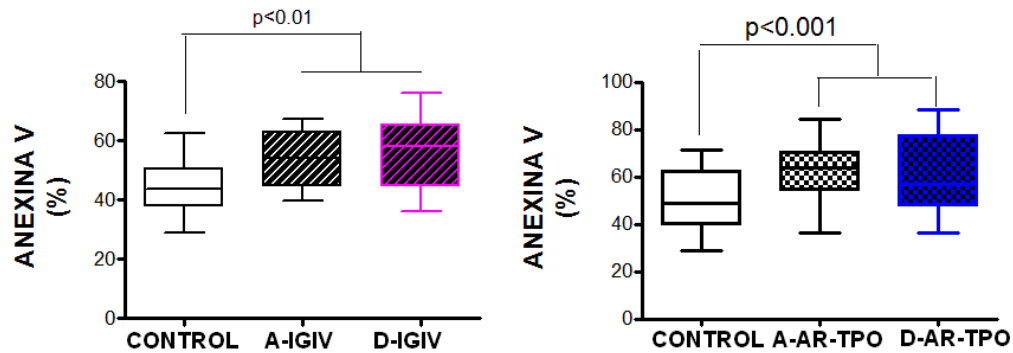
Con el objeto de determinar si esta disminución en la capacidad de activación de las plaquetas tras la activación del receptor de fibrinógeno con TRAP podía deberse a que los pacientes diagnosticados de PTI presentaban un menor número de receptores para el fibrinógeno, determinamos la presencia de las subunidades alfa2b y beta3 que componen dicho receptor. No observamos diferencias en la expresión de ambas subunidades en los pacientes con PTI respecto a los controles.



**Figura 30. Expresión del receptor del fibrinógeno en la superficie de las plaquetas.** En el panel superior se observa la unión de un anticuerpo específico frente a la subunidad alfa IIb, y en el inferior frente a la subunidad beta 3. Se usó el test de Wilcoxon para muestras pareadas para comparar los datos de los pacientes con PTI antes y después de los tratamientos.

### 5.2.6 Estudio de la apoptosis de las plaquetas

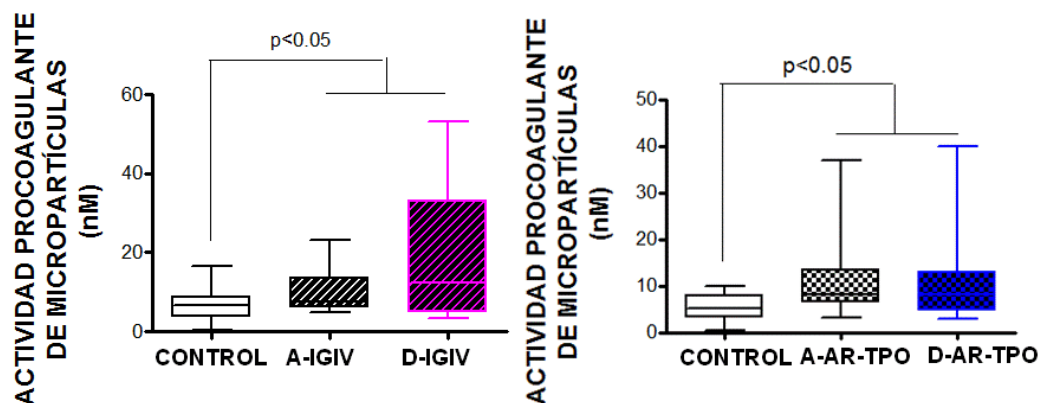
Como consecuencia de la apoptosis de las plaquetas, queda expuesta PS en su superficie. Por ello decidimos determinar la exposición de PS en las plaquetas de los pacientes diagnosticados de PTI antes y después de recibir tratamiento y compararlos con los controles sanos. Para ello, las plaquetas fueron incubadas con anexina V y se analizaron por citometría de flujo. Las plaquetas de todos los pacientes con PTI, antes y después de responder a los tratamientos, mostraron exponían más PS, lo que se sugiere que las plaquetas de los pacientes con PTI presentan un mayor grado de apoptosis.



**Figura 31. Unión de anexina V a la superficie de las plaquetas.** Se muestra la unión de anexina V a plaquetas en estado basal, expresada como el porcentaje de células positivas. Se usó el test de Wilcoxon para muestras pareadas para comparar los datos de los pacientes con PTI antes y después de los tratamientos.

### 5.2.7 Evaluación de la capacidad trombogénica asociada a la PS de las micropartículas

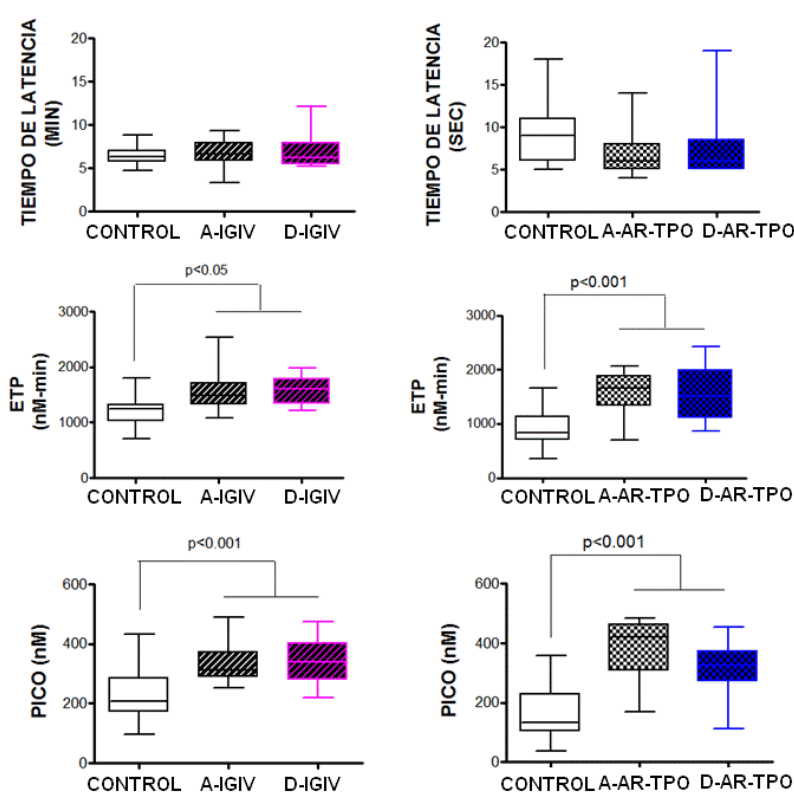
Todos los pacientes con PTI, antes y después de responder a los tratamientos, presentaron mayor capacidad trombogénica asociada a micropartículas que el grupo control.



**Figura 32. Actividad procoagulante asociada a la PS de las micropartículas.** Se muestra la capacidad procoagulante asociada a micropartículas determinada con el kit de Zymuphen. Se usó el test de Wilcoxon para muestras pareadas para comparar los datos de los pacientes con PTI antes y después de los tratamientos.

### 5.2.8 Evaluación de la capacidad trombogénica asociada al plasma.

Para determinar la capacidad trombogénica asociada al plasma, se midió la generación de trombina mediante CAT. El plasma de los pacientes diagnosticados de PTI, antes y después de responder a los tratamientos, generó más trombina (mayor ETP y pico) que los controles, aunque no hubo diferencias entre los grupos en el TL.

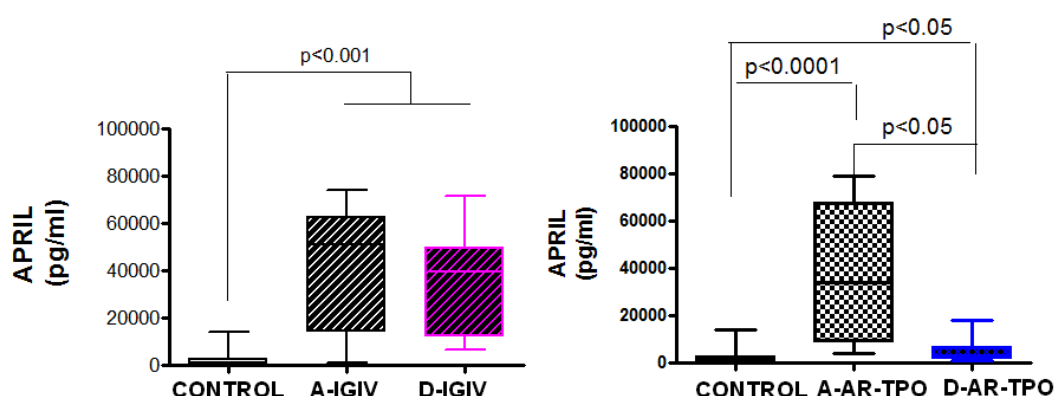


**Figura 33. Actividad procoagulante del plasma de los pacientes con PTI que responden a los tratamientos con IGIV y con AR-TPO.** La capacidad procoagulante asociada al plasma se evaluó con CAT. Se usó el test de Wilcoxon para muestras pareadas para comparar los datos de los pacientes con PTI antes y después de los tratamientos.



### 5.2.9 Estudio de los niveles plasmáticos de APRIL

Se determinaron los niveles de APRIL en los pacientes antes y después de los tratamientos y se compararon con el grupo control. Los niveles de APRIL disminuyeron en los pacientes con PTI que respondieron a los AR-TPO alcanzando los niveles observados en el grupo control.



**Figura 34. Niveles plasmáticos de APRIL en los distintos grupos.** Los niveles de APRIL en plasma se determinaron por ELISA. Se usó el test de Wilcoxon para muestras pareadas para comparar los datos de los pacientes con PTI antes y después de los tratamientos.

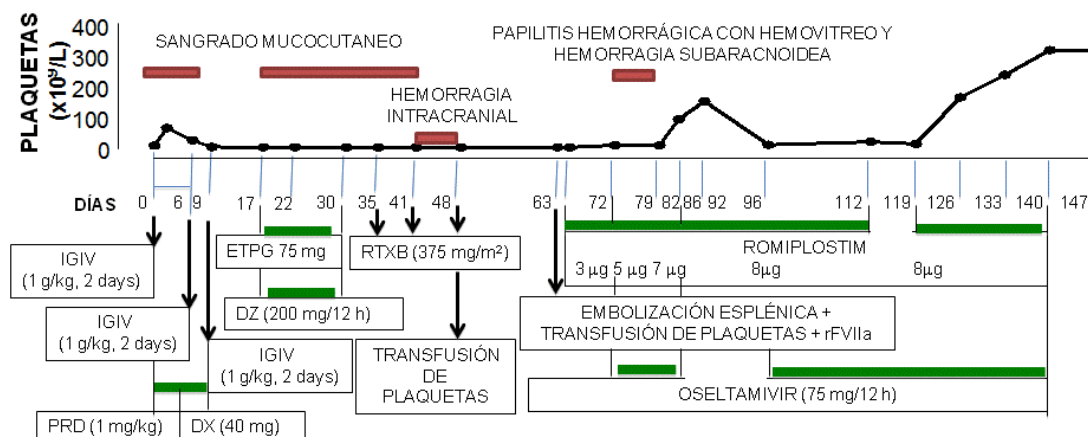
### 5.3 CASO CLÍNICO

Presentamos un caso de un paciente varón de 51 años de edad que acude al Servicio de Urgencias por clínica hemorrágica mucocutánea de 24 horas de evolución (petequias en miembros superiores e inferiores y bulla hemorrágica en el paladar). Refería odinofagia con tos seca en las últimas semanas, y dos meses antes se había vacunado de la gripe. Como antecedentes presentaba una infección por VIH desde 1988, en tratamiento antirretroviral en ese momento con Viread®, Isenetress®, Intelence®, en la última revisión, diez días antes del ingreso, presentaba CD4: 26% (446.8 / $\mu$ L) y carga viral (CV) indetectable. Neumonía por pneumocistis jiroveci en 1996. Anti-VHC con CV indetectable, anti-HBs y anti-HBc positivo con anti-HBe negativo sin datos de

hepatopatía crónica. Dislipemia secundaria a tratamiento antirretroviral con buen control. Diabetes mellitus tipo 2 secundaria a pentamidina. Presentaba una cifra de plaquetas a su llegada de  $7 \times 10^9/L$  con leucocitos y hemoglobina, así como extensión de sangre periférica dentro de la normalidad, salvo trombocitopenia comprobada. Ante la sospecha diagnóstica de PTI se inició tratamiento con PRD a 1mg/kg más IGIV 1g/kgx2 días, presentando una subida transitoria de la cifra de plaquetas a  $64 \times 10^9/L$ , pero a los cuatro días presentó nuevo descenso a  $23 \times 10^9/L$  plaquetas, recibiendo una dosis de IGIV a 1g/kg. Dos días después se realizó un nuevo hemograma presentando  $2 \times 10^9/L$  plaquetas, se le administraron IGIV x2 días y se cambió la PRD por DXM 40 mgx4 días. En ese momento se le realiza un aspirado-biopsia de médula ósea en el que no se obtuvo grumo, pero la biopsia no presentaba signos de malignidad. Asimismo, por los antecedentes del paciente, se realizaron cultivos y PCR en médula ósea para Leishmania, así como baciloscopia, siendo todos estériles.

A los 17 días de comienzo de la PTI, el paciente presenta  $1 \times 10^9/L$  plaquetas con sangrado mucocutáneo, por lo que se decide iniciar un tratamiento de segunda línea, con un AR-TPO, eltrombopag, tras desestimar la esplenectomía por el riesgo de sangrado perioperatorio. Ante la falta de respuesta a eltrombopag, y debido a que el paciente tenía antecedentes familiares de enfermedades reumatológicas, lupus eritematoso sistémico (LES), se inició tratamiento con Danazol a 400 mg/12 horas. Reexplorando al paciente se objetivó una esplenomegalia de 17 cm, con la sospecha diagnóstica de linfoma esplénico, y al no presentar adenopatías que nos permitieran el diagnóstico, se inició tratamiento con anti-CD20, recibiendo tres semanas a 375 mg/m<sup>2</sup>. Tras este tratamiento no disminuyó el tamaño del bazo por lo que se descartó el linfoma esplénico. Mientras estaba en tratamiento con Rituximab sufrió una hemorragia

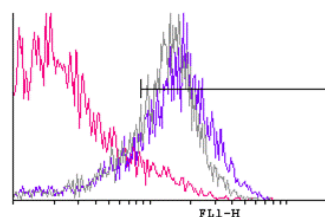
cerebral intracraneal, y se continuó tratamiento para la PTI con embolización esplénica. Se embolizó la mitad del bazo, previa administración de factor VII recombinante activado (rFVIIa) a 90 µg/kg y transfusión de plaquetas, sin obtener respuesta en la cifra de plaquetas. En esa misma semana comenzó tratamiento con el otro AR-TPO, romiplostim, a 3 µg/kg, a los cinco días de iniciar éste, tuvo una papilitis hemorrágica bilateral con hemovítreo y una hemorragia subaracnoidea. En ese momento se añadió al tratamiento con romiplostim un inhibidor de la neuroaminidasa, el oseltamivir, a una dosis de 75 mg cada 12 horas, durante diez días con aumento de la cifra de plaquetas, alcanzando la remisión completa (RC). Conjuntamente presentó neutropenia moderada atribuida al tratamiento con Rituximab, que se resolvió espontáneamente. Una vez alcanzada la RC, se suspendió el oseltamivir, continuando con romiplostim a 7 µg/kg, pero la cifra de plaquetas volvió a descender hasta  $9 \times 10^9/L$ . Se reintrodujo el oseltamivir suspendiendo en ese momento el romiplostim. Tras 12 días con oseltamivir, la cifra de plaquetas permanecía por debajo de  $15 \times 10^9/L$ , por lo que se decidió reintroducir el romiplostim a 8 µg/kg, ya que en nuestro paciente parecía insuficiente la monoterapia, posiblemente por estar implicados varios mecanismos en su destrucción plaquetaria. Con la terapia combinada de oseltamivir y romiplostim, la cifra de plaquetas aumentó a  $92 \times 10^9/L$ . Cuando alcanzó una cifra de plaquetas de  $>250 \times 10^9/L$ , iniciamos pauta descendente de oseltamivir hasta su retirada. Una vez suspendido el oseltamivir el paciente permaneció asintomático y con cifra de plaquetas mayor de  $250 \times 10^9/L$  por lo que decidimos suspender también el AR-TPO. Actualmente el paciente se encuentra en remisión completa sin ningún tratamiento para la PTI.



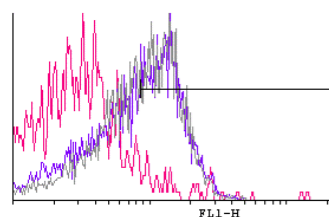
**Figura 35. Recuento de plaquetas, episodios hemorrágicos y tratamiento en la evolución del paciente.**  
PRD: prednisona, DX: dexametasona ETPG: eltrombopag, RTX: rituximab, Dz: danazol.

UNIÓN DE PAC1

TRAP



ADP



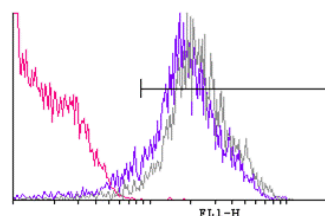
— PACIENTE ANTES DE RESPONDER

— PACIENTE DESPUÉS DE RESPONDER

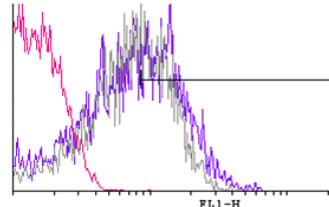
— CONTROL

UNIÓN DE anti P-SELECTINA

TRAP



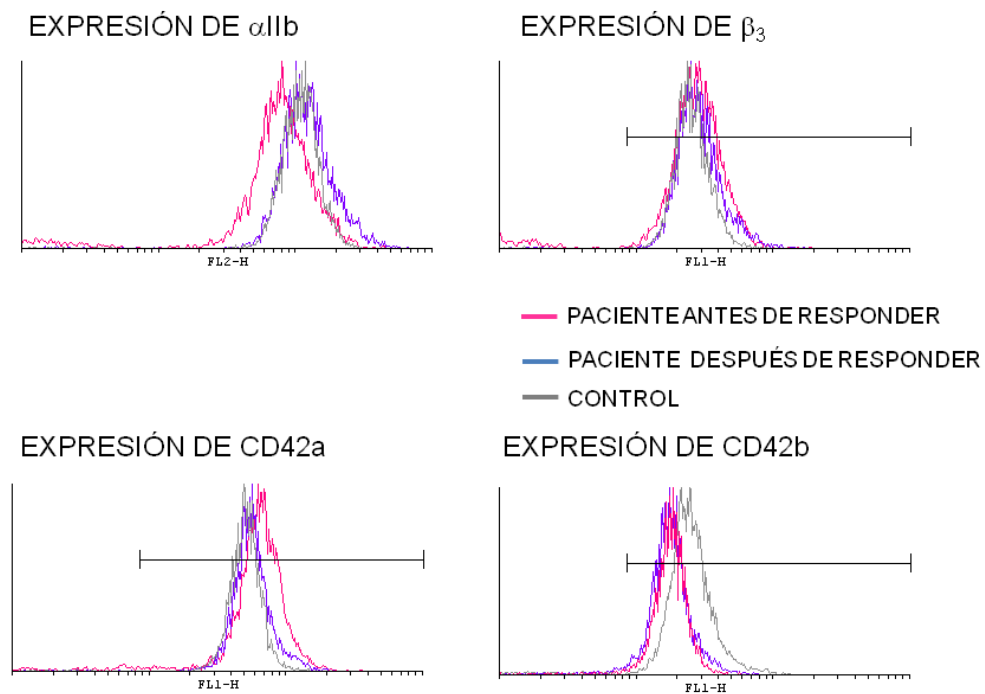
ADP



**Figura 36. Evaluación de la activación plaquetaria en el paciente determinada por citometría de flujo antes y después de responder al tratamiento.**

Los estudios de funcionalidad plaquetaria realizados en el momento del diagnóstico, presentaron una disminución de la función plaquetaria con todos los agonistas y una disminución moderada de la sialización de sus GP de membrana.

Sin embargo, tras su respuesta al tratamiento se normalizó su funcionalidad plaquetaria, así como el número de plaquetas reticuladas, y mejoró la sialización de sus GP de membrana.



**Figura 37. Expresión del receptor del fibrinógeno en la superficie de las plaquetas del paciente antes y después de responder a tratamiento.**

## **6.DISCUSIÓN**

El objetivo principal de este trabajo de tesis fue evaluar los efectos de los distintos tratamientos en la función plaquetaria de los pacientes diagnosticados de PTI.

Para esto estudiamos las características de los siguientes grupos de pacientes en comparación con controles sanos:

- Pacientes con PTI sin tratamiento o tratados con IGIV, corticoides, AR-TPO, o esplenectomizados a los que se les tomó una única muestra de sangre (Estudio transversal).
- Pacientes diagnosticados de PTI antes y después de recibir tratamiento con IGIV o con AR-TPO (Estudio longitudinal).

Por último, también describimos el caso de un paciente con clínica hemorrágica grave y refractario a múltiples tratamientos en el que el estudio realizado en el laboratorio permitió orientar el abordaje terapéutico.

## **6.1 ESTUDIO TRANSVERSAL DE LAS PLAQUETAS DE PACIENTES SOMETIDOS A DISTINTOS TRATAMIENTOS**

### **6.1.1. Recuento de plaquetas en los distintos grupos**

La cifra de plaquetas de los diferentes grupos de los pacientes con PTI fue menor a la de los controles. El objetivo del tratamiento en los pacientes con PTI no es alcanzar una cifra de plaquetas en rangos de normalidad, sino alcanzar una cifra segura que evite la aparición de eventos hemorrágicos[140]Este objetivo se ha alcanzado en nuestra

cohorte de pacientes ya que, si bien su recuento plaquetario era significativamente menor, no presentaban clínica hemorrágica. En nuestra cohorte de pacientes con PTI los que fueron esplenectomizados recuperaron el número de plaquetas sin diferir de los niveles del grupo control. Solamente uno de ellos (paciente 3) presentaba trombocitopenia a los cuatro años de ser esplenectomizado. Esta situación coincide con lo descrito en trabajos previos que indican que hasta un 80% de los pacientes alcanzan respuesta con la esplenectomía, aunque aproximadamente un tercio de los pacientes recaen a los 5 años [89].

#### **6.1.2 Niveles de trombopoyetina en los pacientes sometidos a distintos tratamientos.**

Los niveles plasmáticos de TPO en todos los pacientes con diagnóstico de PTI, tanto los que recibieron tratamiento como los que no, fueron más altos que en los controles. La TPO es el regulador principal de la producción de plaquetas, actúa amplificando la producción basal de MKs y de las propias plaquetas. Se ha descrito que en aquellos pacientes que presentan trombocitopenia, existe una masa plaquetaria insuficiente, incapaz de retirar la TPO de la circulación, resultando en unos niveles de TPO elevados [17]. Este mecanismo de retroalimentación indica que niveles bajos de plaquetas se traducen en niveles elevados de TPO, que estimulan la producción de MKs y plaquetas. Sin embargo, el nivel plasmático de TPO es más bajo que el que se ha descrito en pacientes con trombocitopenia central [141]. Esto podría deberse a que el receptor para la TPO en los pacientes con PTI no ha perdido totalmente su funcionalidad [17]. Los niveles plasmáticos de TPO en los pacientes sometidos a esplenectomía fueron similares



a los del grupo control, lo que coincide con los resultados publicados previamente [142, 143], y se explica por la recuperación del número de plaquetas.

### **6.1.3 Número de plaquetas inmaduras en los distintos grupos**

Las plaquetas inmaduras o reticuladas (PR) son las formas más jóvenes de plaquetas circulantes que contienen ácido ribonucleico (ARN) residual. Son consideradas un marcador de la actividad megacariocítica[144] y su porcentaje se utiliza como indicador de la velocidad de producción de las mismas [145, 146]. Si se asume que la vida media de las plaquetas es de aproximadamente 10 días y que la mayoría de ARN plaquetario se degrada en 24 horas, el porcentaje de PR circulantes sería del 10%[147]. Se ha observado un aumento de la cifra de PR en situaciones de trombocitopenia que conllevan un aumento del consumo periférico de plaquetas como en la PTI, el lupus eritematoso sistémico, la púrpura trombótica trombocitopénica, la coagulopatía de consumo o el síndrome hemolítico urémico[147]. En los pacientes con PTI estos niveles elevados de PR probablemente traducen esa megacariopoyesis parcialmente ineficaz que trata de compensar la destrucción periférica de plaquetas. En nuestra cohorte, el número de plaquetas reticuladas en los pacientes diagnosticados de PTI en tratamiento o no, fueron más altos que en el grupo control. Esta diferencia fue más marcada en el grupo que recibió IGIV, posiblemente porque los pacientes eran los que presentaban las cifras de plaquetas más bajas en el momento del inicio de tratamiento, y por tanto generaron más plaquetas “jóvenes”. Se ha sugerido que las PR son más reactivas que las que no poseen restos de ácidos nucleicos y el hecho de que estén aumentadas en los pacientes con PTI

hace que estos pacientes presenten menor clínica hemorrágica a pesar de las cifras de plaquetas bajas[136].

En nuestro análisis no se encontraron diferencias en el número de plaquetas inmaduras entre los pacientes sometidos a esplenectomía y el grupo control. Esto puede deberse a que al haber aumentado significativamente la cifra de plaquetas tras la esplenectomía, no exista el estímulo necesario para producir “plaquetas jóvenes” que se encarguen de la hemostasia[148].

#### **6.1.4 Niveles plasmáticos de APRIL**

Los niveles elevados de APRIL se han implicado en la etiopatogenia de la PTI, ya que favorecen la proliferación y diferenciación de los linfocitos B, lo que se traduce en una estimulación de la respuesta inmune mediada por anticuerpos[149]. En los pacientes incluídos en nuestro estudio los niveles de APRIL fueron superiores en los pacientes con PTI respecto al grupo control, algo que nuestro grupo ya había publicado recientemente[133]. Se han encontrado niveles elevados de APRIL en otras patologías autoinmunes como lupus eritematoso sistémico o artritis reumatoide[150]. Los niveles alcanzados en los pacientes que recibieron IGIV y corticoides fueron significativamente superiores al resto de los grupos. Esta observación, en lo referente al efecto de las IGIV sobre el APRIL, podría explicarse por el hecho de que esta terapia, que es de acción más rápida, de primera línea o de rescate, ejerce menor efecto sobre el sistema inmune. Con respecto de los niveles más elevados de APRIL en los pacientes tratados con corticoides, tenemos que comentar que encontramos una dispersión alta en los resultados, pero que

la mediana se aproxima a los valores del grupo control. Se ha descrito que los niveles de APRIL se encuentran elevados en pacientes con PTI que no han recibido tratamiento, pero que se reducen hasta cifras comparables a controles sanos tras recibir tratamiento con corticoides o esplenectomía[151].

#### **6.1.5 Estudio de la funcionalidad plaquetaria**

El documento de consenso del IWG refiere que aunque la gravedad de la trombocitopenia guarda una cierta correlación con la clínica hemorrágica, no es el único factor involucrado[47]. Entre estos factores podríamos incluir la función plaquetaria. En nuestra cohorte se observó una disminución en la activación de las plaquetas inducida por agonistas que no se debía a una disminución en la expresión de los receptores para el fibrinógeno en su superficie. En este sentido Psaila y cols. observaron que aquellos pacientes con PTI que presentaban clínica hemorrágica tenían una mayor alteración en la activación plaquetaria que aquellos que no presentaron clínica hemorrágica[152].

La P-selectina se ha empleado como marcador para determinar la activación plaquetaria y la capacidad de liberación del contenido de sus gránulos. Observamos que la capacidad de liberación de los gránulos en todos los pacientes fue similar a la del grupo control. En el estudio de Frelinger y cols. se observó que niveles más elevados de P-selectina en la superficie de plaquetas no estimuladas se correlacionaban con una mayor presencia de clínica hemorrágica [153]. La capacidad de activación de las plaquetas de los pacientes con PTI esplenectomizados fue menor que la de los controles. Este hecho coincide con lo observado en los otros grupos de pacientes con PTI tratados con otras terapias farmacológicas. Esta observación parece indicar que si bien la esplenectomía mejora el

efecto periférico de destrucción de las plaquetas, parece no modificar la producción de unas plaquetas disfuncionales[154].

#### **6.1.6 Estudio de la apoptosis en las plaquetas**

En apoyo a la hipótesis de la generación de plaquetas disfuncionales, las plaquetas de los pacientes tratados con IGIV, AR-TPO y esplenectomizados exponían más PS en su superficie que las del grupo control, indicando un mayor grado de apoptosis. Nuestro grupo ha descrito previamente una relación inversa entre el grado de apoptosis, evaluado como el nivel de exposición de PS de las plaquetas, y su capacidad de estimulación en una cohorte de pacientes con síndrome mielodisplásico (SMD)[141]. En apoyo de estos resultados se ha descrito que la inhibición de BCL-xL en ratones con ABT-263 causa una disminución en la capacidad de activación del receptor de fibrinógeno en las plaquetas que exponen niveles de PS altos [155].

#### **6.1.7 Evaluación de la capacidad trombogénica de las plaquetas asociada a micropartículas**

Muchos de los pacientes con PTI incluidos en este estudio no presentaban episodios hemorrágicos a pesar de tener cifras de plaquetas bajas. Este hecho nos sugirió la existencia de algún mecanismo procoagulante compensatorio de la trombocitopenia. Por otra parte, diversas publicaciones indican la existencia de un riesgo trombótico aumentado en los pacientes diagnosticados de PTI [72, 73]. El hecho de que la destrucción de las plaquetas puedan generar MPs celulares nos hizo plantearnos la

posibilidad de que las MPS pudieran tener un papel en este sentido [156]. Existen referencias que indican que las MPs pueden tener un papel procoagulante muy importante [157]. Nuestro grupo de pacientes presentaron una mayor capacidad trombogénica asociada a MPs que el grupo control y esto fue aún mayor en los pacientes tratados con IGIV, AR-TPO y en los esplenectomizados. Si bien se ha descrito que los pacientes con PTI esplenectomizados presentan hasta 3-4 veces más eventos trombóticos, este riesgo no se debería solo a un aumento de MPs ya que su capacidad trombogénica no fue mayor que la de los otros grupos [72]. Las MPs pueden liberarse por activación o por apoptosis celular [158]. El hecho de que en los pacientes con PTI la activación esté disminuída nos sugiere que las MPs se originan debido a la apoptosis plaquetaria. En este sentido Goette y cols. refirieron la existencia de una apoptosis aumentada en las plaquetas de los pacientes con PTI [159]. La actividad procoagulante de las MPs está asociada a su contenido de PS y de FT [160]. Los pacientes con PTI tenían mayor capacidad procoagulante asociada a la PS de las MPs, pero no al FT (datos no mostrados). Este hallazgo concuerda con el hecho de que los pacientes con PTI tienen un aumento en la cantidad de MPs de plaquetas y de glóbulos rojos [161, 162] y estas células carecen de niveles significativos de FT [163-165]. Si bien parece existir consenso respecto del origen celular de las MPs en los pacientes con PTI, nuestro análisis del origen de las MPs en la población de pacientes esplenectomizados mostró una gran variabilidad respecto de la cantidad y origen de las MPs.

### **6.1.8 Actividad procoagulante del plasma**

El plasma de todos los pacientes de PTI incluidos en el estudio presentó una actividad procoagulante aumentada, independientemente del tratamiento que recibían. Teniendo en cuenta las condiciones experimentales en que se realizaron los estudios de CAT, las características procoagulantes del plasma de los pacientes con PTI parecen depender de algún factor plasmático y no de las MPs o de la trombocitopenia observada en estos pacientes. Respaldan esta teoría los datos publicados por nuestro grupo que refieren que la existencia de trombocitopenia no incrementa la generación de trombina en plasma, dado que pacientes con SMD y trombocitopenia presentan una generación de trombina en plasma similar a los controles sanos [141].

Este hecho tampoco se debió a un aumento en la cantidad de factores de la coagulación y el fibrinógeno (datos no presentados), pero podía ser consecuencia de la resistencia a la proteína C [162].

### **6.1.9 Seguimiento en el tiempo de un paciente esplenectomizado**

Si bien somos conscientes de la limitación que supone las observaciones de un único caso para sacar algún tipo de conclusión, creímos ilustrativo mostrar la evolución de la generación de MPs y del número de plaquetas en un paciente con PTI esplenectomizado. Observamos un aumento fluctuante en la cifra de MPs de origen plaquetario cuyo aumento se correspondía con una disminución en el número de plaquetas, un aumento de la exposición de PS y una disminución de la capacidad de activación del receptor de fibrinógeno.

## 6.2 ESTUDIO LONGITUDINAL

Llevamos a cabo un estudio longitudinal con el objeto de evaluar si los tratamientos producían un cambio en la hemostasia de los pacientes más allá del aumento de las plaquetas circulantes. Para esto medimos ciertas variables relacionadas con la función plaquetaria en los pacientes diagnosticados de PTI antes y después de recibir tratamiento con IGIV o AR-TPO, y se compararon con el grupo control.

### 6.2.1 Recuento de las plaquetas en distintos grupos

Los pacientes con PTI que respondieron a IGIV o a los AR-TPO recuperaron el número de plaquetas sin alcanzar los niveles del grupo control. Como indicábamos antes, el objetivo del tratamiento no es alcanzar una cifra normal de plaquetas, sino una cifra segura con el fin de evitar eventos hemorrágicos. Si bien todos los pacientes sometidos a tratamiento con IGIV alcanzaron una cifra segura, en 3 de ellos (pacientes 3, 5 y 11) la cifra de plaquetas no aumentó significativamente. Estos resultados concuerdan con los de Mayer y cols. quienes observaron que un 70-80% de los pacientes sometidos a tratamiento con IGIV respondían aumentando el número de plaquetas y que en el resto, si bien no aumentaba el recuento plaquetario, sí se frenaba o impedía la presentación de eventos hemorrágicos [87]. Todos los pacientes sometidos al tratamiento con AR-TPO respondieron, presentando una cifra de plaquetas cercana a  $100 \times 10^9/L$ . Dos de los pacientes tratados con eltrombopag habían recibido previamente tratamiento con romiplostim y el cambio de tratamiento se debió, en un caso, por un efecto adverso (paciente nº6) y, en otro, a presentar dificultades para el ajuste de la dosis (paciente nº8). En un tercer paciente (nº 12) se sustituyó eltrombopag por romiplostim debido a

una pérdida de respuesta al primero. En general estos resultados concuerdan con los datos de eficacia de los ensayos con ambos fármacos, encontrando una tasa de respuesta superior al 90% con romiplostim [109], y una respuesta del 85.8% en los pacientes que recibieron tratamiento con eltrombopag reportada por Bussel. Existen varios estudios donde se recogen casos de pacientes que han obtenido buena respuesta aun AR-TPO tras haber recibido el otro previamente. Los motivos de cambio de un agonista a otro fueron pérdida de eficacia, preferencia del paciente, cifra de plaquetas fluctuante o debido a los efectos secundarios. Con el cambio de agente se alcanzaron respuestas en un 50-80% de los pacientes [110, 111].

#### **6.2.2 Evaluación de los niveles de TPO en los pacientes antes y después de recibir tratamiento.**

Todos los pacientes con PTI incluidos presentaron niveles de TPO elevados respecto de los controles antes y después de responder al tratamiento. Esto indicaría que el mecanismo de retroalimentación de las plaquetas sobre los niveles de TPO no es lo suficientemente sensible como para detectar el incremento en el número de plaquetas que producen los fármacos en estudio[166].

#### **6.2.3 Plaquetas inmaduras en los distintos grupos antes y después de responder a tratamiento**

Las plaquetas inmaduras o reticuladas (PR) son consideradas un marcador de la actividad megacariocítica[167]. El número de PR en los pacientes diagnosticados de PTI antes de



responder a los tratamientos fueron significativamente más altos que en los controles. Se ha sugerido que los niveles de plaquetas reticuladas podrían predecir la posibilidad de discontinuar el tratamiento con AR-TPO[168].

#### **6.2.4 Estudio de la capacidad de activación de las plaquetas antes y después de responder a los tratamientos**

Los tratamientos con IGIV o con los AR-TPO aumentaron el recuento de plaquetas, pero no mejoraron la capacidad de activación de las mismas. Nuestros resultados fueron similares a los de Psaila [169] quienes tampoco encontraron diferencias significativas entre las plaquetas de los pacientes con PTI y los controles en lo referente a la expresión basal de los receptores de fibrinógeno y a una respuesta a TRAP disminuída antes de comenzar el tratamiento con eltrombopag. Sin embargo, estos autores refirieron que el tratamiento con eltrombopag mejoraba la capacidad de activación de las plaquetas. Por otra parte, Panzer y cols [170] propusieron que las plaquetas de los pacientes con PTI estaban más activadas *in vivo* y que ese era el motivo por el cual respondían menos a la estimulación con TRAP en los experimentos *in vitro*. La capacidad de liberación de los gránulos en los pacientes antes y después de recibir los tratamientos fue similar al grupo control en ambos grupos. En contraposición con estos resultados, Panzer encontró diferencias en la expresión de P-selectina entre los sujetos con PTI y los controles sanos [171].

### **6.2.5 Estudio de la apoptosis de las plaquetas**

Las plaquetas de todos los pacientes con PTI, antes y después de responder a los tratamientos, mostraron que exponían más PS, lo que sugirió que las plaquetas de los pacientes con PTI presentaban un mayor grado de apoptosis. Se ha descrito que la expresión de PS en la superficie plaquetaria puede deberse a la activación de las plaquetas o para indicar que son células “no deseadas” e inducir la apoptosis[23]. Dado que en nuestro estudio hemos demostrado que la activación plaquetaria está disminuída, pensamos que este aumento de PS se debía a un aumento en la apoptosis. Este aumento en la exposición en superficie de la PS podría contribuir al perfil procoagulante protector de la aparición de manifestaciones hemorrágicas en pacientes con PTI y trombocitopenia ya que es el sitio de ensamblaje del complejo protrombinasa. En apoyo de esta hipótesis, un trabajo de nuestro grupo ha demostrado que las plaquetas de los pacientes con PTI unen más complejo protrombinasa que las de los controles sanos[172].

### **6.2.6 Evaluación de la capacidad trombogénica asociada a la PS de las micropartículas**

Como se ha comentado anteriormente, se ha descrito la existencia de un riesgo trombótico aumentado en los pacientes diagnosticados de PTI, que podría aumentar como consecuencia del tratamiento con los AR-TPO[173]. En nuestra cohorte, todos los pacientes con PTI, antes y después de responder a los tratamientos, presentaron mayor capacidad trombogénica asociada a MPS que el grupo control. Este resultado es

compatible con el hecho de que las plaquetas de los pacientes de PTI no presentasen menos signos de apoptosis (exposición de PS) después de responder a los tratamientos. A pesar de ello, ninguno de los pacientes presentó eventos tromboembólicos.

En un estudio llevado a cabo en pacientes con diversas patologías autoinmunes que recibieron tratamiento con IGIV observaron complicaciones trombóticas en un 13% de los pacientes tratados. Sin embargo, destacaron que los pacientes frecuentemente presentaban patologías concomitantes que les conferían un riesgo aumentado de enfermedad tromboembólica[174].

#### **6.2.7 Evaluación de la capacidad trombogénica asociada al plasma.**

El plasma de los pacientes diagnosticados de PTI, antes y después de responder a los tratamientos, generó más trombina (mayor ETP y pico) que los controles. En un estudio retrospectivo publicado recientemente se evaluó el efecto del tratamiento con los AR-TPO en la coagulación de pacientes diagnosticados de PTI empleando el D-dímero como marcador de activación de la coagulación [175]. Este estudio reveló que existía una disminución en los niveles de D-dímero tras responder a tratamiento con los AR-TPO, sin embargo, los propios autores reconocen la limitación que supone el haber determinado únicamente los niveles de D-dímero en estos pacientes. Otro grupo publicó un estudio donde observaron una elevación en los niveles de FVIII, FIX y FXI en los pacientes diagnosticados de PTI [161]. Este hecho no parece explicar de forma aislada el aumento del ETP y de los valores pico de la generación de trombina, ya que en las condiciones en las que se hicieron los experimentos de CAT (1 pM de FT), estos no dependían de los

niveles de FVIII, F IX y FXI, sugiriendo que deben existir otras alteraciones involucradas en este proceso [176].

#### **6.2.8 Estudio de los niveles plasmáticos de APRIL**

En nuestro grupo de pacientes estudiados los niveles de APRIL disminuyeron en los pacientes con PTI que respondieron a los AR-TPO alcanzando los niveles observados en el grupo control.

Estos datos ya fueron publicados por nuestro grupo observando que los niveles de APRIL se correlacionaban indirectamente con la cifra de plaquetas [177]. Resultados similares fueron publicados previamente por Gu y cols., quienes observaron que pacientes con PTI y trombocitopenia presentaban niveles de APRIL más altos que pacientes con PTI en remisión (que no presentaban trombocitopenia)[149]. Dado que APRIL es un factor que promueve la maduración de las células B y su supervivencia estas observaciones avalan la teoría del papel de APRIL en la etiopatogenia de esta patología.

Asimismo, en el artículo de Gu y cols., no se refirieron diferencias entre los niveles plasmáticos de APRIL en controles sanos respecto a un grupo de pacientes con PTI y cifras normales en el recuento de plaquetas, lo que fue explicado por estar en tratamiento con corticoides o por haber sido previamente esplenectomizados. Sin embargo, en nuestro grupo de pacientes en tratamiento con AR-TPO solamente dos de ellos habían sido esplenectomizados previamente y uno estaba recibiendo tratamiento concomitante con corticoides, por lo que en esta cohorte, la disminución en los niveles de APRIL tuvo que deberse a otro motivo. Se ha especulado que pueda ser la cifra de

plaquetas, en cierto modo, la que regule los niveles plasmáticos de APRIL. Aunque esto parece poco probable, dado que existen otras patologías autoinmunes en que los niveles de APRIL son tan altos como los observados en pacientes con PTI, a pesar de presentar cifras de plaquetas dentro de la normalidad [178]. Además, pacientes con PTI que responden a IGIV presentan niveles plasmáticos de APRIL elevados con cifras de plaquetas normales.

En la publicación de Bao y cols. se ha comunicado un efecto beneficioso del tratamiento con AR-TPO sobre el sistema inmune [103]. En su estudio observaron que niveles de TGF- $\beta$ 1, una citoquina encargada de inhibir la proliferación y la producción de anticuerpos por las células B, se encontraba aumentada en pacientes con PTI que respondían a AR-TPO [179]. Esto hace suponer que los AR-TPO pueden ejercer un efecto inmunomodulador añadido a su efecto sobre la megacariopoyesis.

### **6.3 CASO CLÍNICO**

En las diferentes guías de tratamiento para pacientes con PTI se incide en la importancia de individualizar el tratamiento. En este caso se trata de un paciente refractario con clínica hemorrágica grave (hemorragia intracraneal), sin respuesta a los tratamientos de primera línea y a algunos de segunda (ambos AR-TPO, embolización esplénica, rituximab), por lo que se decidió tratamiento empírico con oseltamivir por no estar disponible en ese momento en nuestro laboratorio un método específico para determinar las GPs de superficie frente a las que estaban dirigidas los autoanticuerpos del paciente. Fue administrado en coadyuvancia con un AR-TPO [133]. El mecanismo de

acción del oseltamivir consiste en que al inhibir la neuraminidasa, mejora la sialización de las GPs de membrana plaquetarias, evitando la interacción con los receptores de Ashwell-Morell de los hepatocitos, evitando por tanto la destrucción de las plaquetas. Probablemente éste fuera el mecanismo de acción por el que fueran destruidas las plaquetas dado que, tras la instauración de dicho tratamiento combinado, se observó un aumento de la cifra de plaquetas y resolución del cuadro clínico. Este caso avala la importancia de conocer el mecanismo patogénico de la PTI en cada caso con el fin de poder individualizar el tratamiento y obtener resultados eficaces.

Como es sabido, la PTI es una enfermedad autoinmune mediada por Ac, dirigidos contra GP de la membrana plaquetaria. En un 70-80% de los pacientes, estos Ac van dirigidos contra la GPIIb/IIIa y, en un 20-40% contra la GPIb/V/IX [180, 181] Estudios recientes, muestran que dependiendo de la GP contra la que van dirigidos los Ac el mecanismo de destrucción plaquetaria es diferente. Así, cuando las plaquetas son opsonizadas por Ac dirigidos contra la GPIIb/IIIa, éstas se unen al receptor para la fracción constante (Fc) de las inmunoglobulinas, presentes en los macrófagos del bazo, y allí son destruidas. Sin embargo, estudios realizados en animales muestran que aquellos que presentan Ac sólo contra la GPIb/V/IX, el mecanismo de destrucción plaquetaria es independiente de la Fc [130, 182, 183].

Los Ac anti-GPIb/V/IX producen una traslocación de la neuraminidasa desde los gránulos hasta la superficie plaquetaria, la cual produciría una pérdida de ácido siálico en la GPIb/V/IX, estas plaquetas sin ácido siálico son captadas por los receptores de Ashwell-Morel de los hepatocitos, donde son destruidas [131, 184].

Esto tiene transcendencia desde el punto de vista terapéutico pues cuando la destrucción es independiente de la unión al receptor para la Fc de las inmunoglobulinas el bloqueo de dicho receptor mediante las IGIV será ineficaz.

Pocos casos han sido publicados sobre el manejo de pacientes con PTI con oseltamivir y ninguno con la asociación de éste con una AR-TPO, romiplostim, como hicimos en nuestro paciente [132, 185-187]. El oseltamivir inhibe la neuroaminidasa, mejorando la sialización de las GPs de la membrana plaquetaria, y en los estudios realizados en nuestro paciente restaura la función plaquetaria a diferencia de lo que ocurría en los pacientes tratados sólo con AR-TPO [133].

La utilización combinada de un fármaco que aumente la producción plaquetaria como el AR-TPO, romiplostim, y otro que reestablezca la sialización de las GP de membrana, como el oseltamivir, puede ser útil en pacientes cuyo mecanismo de destrucción sea combinado, esplénico y hepático.

## **7.CONCLUSIONES**



7.1 El mecanismo etiopatogénico de la PTI es la suma de una destrucción periférica y de una disminución de la megacariopoyesis producida no sólo por un funcionamiento inadecuado de la TPO, sino por una compleja disregulación del sistema inmune. Estos pacientes presentan un alto número de plaquetas reticuladas o inmaduras, que probablemente traducen esa megacariopoyesis parcialmente ineficaz que trata de compensar la destrucción periférica. Además, las plaquetas tienen una menor capacidad de ser activadas por agonistas que podría deberse a un aumento en su apoptosis. Estos pacientes presentan un aumento en la capacidad procoagulante del plasma, así como de la asociada a MPs. Este hecho podría explicar por qué las manifestaciones hemorrágicas en estos pacientes son menores de lo que cabría esperar con la cifra de plaquetas que presentan. Las características de las plaquetas de los pacientes con PTI son similares en todos los grupos tratados con los diferentes abordajes terapéuticos.

7.2 La respuesta al tratamiento con IGIV o AR-TPO de los pacientes con PTI conlleva una recuperación en la cifra de plaquetas, aunque no implica una modificación en los niveles de TPO, ni una mejora de la funcionalidad plaquetaria ni un aumento del riesgo de trombosis. Los niveles de APRIL disminuyeron en los pacientes con PTI que respondieron a los AR-TPO alcanzando los niveles observados en el grupo control, esto podría indicar que los AR-TPO podrían poseer una actividad inmunomoduladora además de su efecto estimulante de la producción de plaquetas.

7.3 Es importante conocer las características de las plaquetas en los pacientes con PTI refractaria, dado que la eficacia del tratamiento administrado puede depender en algunos casos de la glicoproteína frente a la que vayan dirigidos los anticuerpos. En los casos en los que el anticuerpo está dirigido frente a la GPIIb/IIIa los tratamientos

habituales no son efectivos, tomando un papel fundamental los inhibidores de la neuraminidasa en la recuperación de la cifra de plaquetas.

## **8.REFERENCIAS**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kaushansky, K., *Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis*. Blood, 2008. **111**(3): p. 981-6.
2. Brewer, D.B., *Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet*. Br J Haematol, 2006. **133**(3): p. 251-8.
3. Gazzaniga, V. and L. Ottini, *The discovery of platelets and their function*. Vesalius 7, 2001: p. 22-26.
4. Ribatti, D. and E. Crivellato, *Giulio Bizzozero and the discovery of platelets*. Leuk Res, 2007. **31**(10): p. 1339-41.
5. Coller, B.S., *Historical perspective and future directions in platelet research*. J Thromb Haemost, 2011. **9 Suppl 1**: p. 374-95.
6. Gremmel, T., A.L. Frelinger, 3rd, and A.D. Michelson, *Platelet Physiology*. Semin Thromb Hemost, 2016. **42**(3): p. 191-204.
7. Sorrentino, S., et al., *Toward correlating structure and mechanics of platelets*. Cell Adh Migr, 2016. **10**(5): p. 568-575.
8. Schulze, H., et al., *Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis*. Blood, 2006. **107**(10): p. 3868-75.
9. Kowata, S., et al., *Platelet demand modulates the type of intravascular protrusion of megakaryocytes in bone marrow*. Thromb Haemost, 2014. **112**(4): p. 743-56.
10. Machlus, K.R. and J.E. Italiano, Jr., *The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation*. J Cell Biol, 2013. **201**(6): p. 785-96.
11. Schachtner, H., et al., *Megakaryocytes assemble podosomes that degrade matrix and protrude through basement membrane*. Blood, 2013. **121**(13): p. 2542-52.
12. Thon, J.N. and J.E. Italiano, *Platelet formation*. Semin Hematol, 2010. **47**(3): p. 220-6.
13. Lefrancais, E., et al., *The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors*. Nature, 2017. **544**(7648): p. 105-109.
14. Wilcox, D.A., *Megakaryocyte- and megakaryocyte precursor-related gene therapies*. Blood, 2016. **127**(10): p. 1260-8.
15. Kuter, D.J., D.L. Beeler, and R.D. Rosenberg, *The purification of megapoeitin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 11104-8.
16. Kuter, D.J., *The biology of thrombopoietin and thrombopoietin receptor agonists*. Int J Hematol, 2013. **98**(1): p. 10-23.
17. Varghese, L.N., et al., *The Thrombopoietin Receptor: Structural Basis of Traffic and Activation by Ligand, Mutations, Agonists, and Mutated Calreticulin*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**: p. 59.

18. Maynard, D.M., et al., *Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(9): p. 1945-55.
19. Angiolillo, D.J., M. Ueno, and S. Goto, *Basic principles of platelet biology and clinical implications*. Circ J, 2010. **74**(4): p. 597-607.
20. De Candia, E., *Mechanisms of platelet activation by thrombin: a short history*. Thromb Res, 2012. **129**(3): p. 250-6.
21. Golebiewska, E.M. and A.W. Poole, *Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond*. Blood Rev, 2015. **29**(3): p. 153-62.
22. Garraud, O., et al., *Bench-to-bedside review: Platelets and active immune functions - new clues for immunopathology?* Crit Care, 2013. **17**(4): p. 236.
23. von Gunten, S., M. Wehrli, and H.U. Simon, *Cell death in immune thrombocytopenia: novel insights and perspectives*. Semin Hematol, 2013. **50 Suppl 1**: p. S109-15.
24. Heemskerk, J.W., E.M. Bevers, and T. Lindhout, *Platelet activation and blood coagulation*. Thromb Haemost, 2002. **88**(2): p. 186-93.
25. Winkler, J., et al., *Platelet apoptosis in paediatric immune thrombocytopenia is ameliorated by intravenous immunoglobulin*. Br J Haematol, 2012. **156**(4): p. 508-15.
26. Catani, L., et al., *Dendritic cells of immune thrombocytopenic purpura (ITP) show increased capacity to present apoptotic platelets to T lymphocytes*. Exp Hematol, 2006. **34**(7): p. 879-87.
27. Hargett, L.A. and N.N. Bauer, *On the origin of microparticles: From "platelet dust" to mediators of intercellular communication*. Pulm Circ, 2013. **3**(2): p. 329-40.
28. Hoyer, F.F., G. Nickenig, and N. Werner, *Microparticles--messengers of biological information*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(9): p. 2250-6.
29. Marchetti, M., et al., *Phospholipid-dependent procoagulant activity is highly expressed by circulating microparticles in patients with essential thrombocythemia*. Am J Hematol, 2014. **89**(1): p. 68-73.
30. Chaturvedi, S., et al., *Circulating microparticles in patients with antiphospholipid antibodies: characterization and associations*. Thromb Res, 2015. **135**(1): p. 102-8.
31. Rodriguez-Carrio, J., et al., *Altered profile of circulating microparticles in rheumatoid arthritis patients*. Clin Sci (Lond), 2015. **128**(7): p. 437-48.
32. Flaumenhaft, R., et al., *Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles*. Blood, 2009. **113**(5): p. 1112-21.
33. Flaumenhaft, R., A.T. Mairuhu, and J.E. Italiano, *Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles*. Semin Thromb Hemost, 2010. **36**(8): p. 881-7.
34. Simak, J. and M.P. Gelderman, *Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers*. Transfus Med Rev, 2006. **20**(1): p. 1-26.
35. Delabranche, X., et al., *Microparticles and infectious diseases*. Med Mal Infect, 2012. **42**(8): p. 335-43.

36. Mause, S.F., *Microparticles as intercellular carriers of the microRNA signal: insights for novel diagnostic and therapeutic approaches*. Thromb Haemost, 2016. **115**(2): p. 236.
37. Zubairova, L.D., et al., *Circulating Microparticles Alter Formation, Structure, and Properties of Fibrin Clots*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 17611.
38. Varon, D., et al., *Involvement of platelet derived microparticles in tumor metastasis and tissue regeneration*. Thromb Res, 2012. **130 Suppl 1**: p. S98-9.
39. Burnouf, T., et al., *Platelet microparticles: detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine*. Blood Rev, 2014. **28**(4): p. 155-66.
40. Burnouf, T., et al., *An overview of the role of microparticles/microvesicles in blood components: Are they clinically beneficial or harmful?* Transfus Apher Sci, 2015. **53**(2): p. 137-45.
41. Nurden, A.T., et al., *Platelets and wound healing*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 3532-48.
42. Terrell, D.R., et al., *The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: A critical review of published reports*. Am J Hematol, 2010. **85**(3): p. 174-80.
43. Schoonen, W.M., et al., *Epidemiology of immune thrombocytopenic purpura in the General Practice Research Database*. Br J Haematol, 2009. **145**(2): p. 235-44.
44. Rodeghiero, F., et al., *Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group*. Blood, 2009. **113**(11): p. 2386-93.
45. Stasi, R., et al., *Long-term observation of 208 adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura*. Am J Med, 1995. **98**(5): p. 436-42.
46. Kuhne, T., et al., *Newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood: an observational study*. Lancet, 2001. **358**(9299): p. 2122-5.
47. Provan, D., et al., *International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia*. Blood, 2010. **115**(2): p. 168-86.
48. Li, Z., M.A. Nardi, and S. Karparkin, *Role of molecular mimicry to HIV-1 peptides in HIV-1-related immunologic thrombocytopenia*. Blood, 2005. **106**(2): p. 572-6.
49. Takahashi, T., et al., *Molecular mimicry by Helicobacter pylori CagA protein may be involved in the pathogenesis of H. pylori-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura*. Br J Haematol, 2004. **124**(1): p. 91-6.
50. Zhang, W., et al., *Role of molecular mimicry of hepatitis C virus protein with platelet GPIIIa in hepatitis C-related immunologic thrombocytopenia*. Blood, 2009. **113**(17): p. 4086-93.
51. Kapur, R., et al., *C-reactive protein enhances IgG-mediated phagocyte responses and thrombocytopenia*. Blood, 2015. **125**(11): p. 1793-802.
52. Li, X., et al., *Defective regulatory B-cell compartment in patients with immune thrombocytopenia*. Blood, 2012. **120**(16): p. 3318-25.
53. Semple, J.W., *Bregging rights in ITP*. Blood, 2012. **120**(16): p. 3169.

54. Olsson, B., et al., *Recruitment of T cells into bone marrow of ITP patients possibly due to elevated expression of VLA-4 and CX3CR1*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1078-84.
55. Ling, Y., et al., *Circulating dendritic cells subsets and CD4+Foxp3+ regulatory T cells in adult patients with chronic ITP before and after treatment with high-dose dexamethasone*. Eur J Haematol, 2007. **79**(4): p. 310-6.
56. Sakakura, M., et al., *Reduced Cd4+Cd25+ T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura*. Thromb Res, 2007. **120**(2): p. 187-93.
57. Zhang, X.L., et al., *De novo induction of platelet-specific CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from CD4(+)CD25(-) cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura*. Blood, 2009. **113**(11): p. 2568-77.
58. Aboul-Fotoh Lel, M., et al., *Role of CD4+CD25+ T cells in children with idiopathic thrombocytopenic purpura*. J Pediatr Hematol Oncol, 2011. **33**(2): p. 81-5.
59. Ji, L., et al., *The ratio of Treg/Th17 cells correlates with the disease activity of primary immune thrombocytopenia*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e50909.
60. Catani, L., et al., *Decreased expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 in dendritic cells contributes to impaired regulatory T cell development in immune thrombocytopenia*. Ann Hematol, 2013. **92**(1): p. 67-78.
61. Yang, Y., et al., *Abnormal Distribution and Function of Monocyte Subsets in Patients With Primary Immune Thrombocytopenia*. Clin Appl Thromb Hemost, 2016: p. 1076029616652726.
62. Consolini, R., A. Legitimo, and M.C. Caparello, *The Centenary of Immune Thrombocytopenia - Part 1: Revising Nomenclature and Pathogenesis*. Front Pediatr, 2016. **4**: p. 102.
63. Li, F., et al., *Insufficient secretion of IL-10 by Tregs compromised its control on over-activated CD4+ T effector cells in newly diagnosed adult immune thrombocytopenia patients*. Immunol Res, 2015. **61**(3): p. 269-80.
64. Wang, J.D., et al., *Reduced expression of transforming growth factor-beta1 and correlated elevation of interleukin-17 and interferon-gamma in pediatric patients with chronic primary immune thrombocytopenia (ITP)*. Pediatr Blood Cancer, 2011. **57**(4): p. 636-40.
65. Guo, Z.X., et al., *The role of Th17 cells in adult patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura*. Eur J Haematol, 2009. **82**(6): p. 488-9.
66. Sollazzo, D., et al., *Circulating CD4+CD161+CD196+ Th17 cells are not increased in immune thrombocytopenia*. Haematologica, 2011. **96**(4): p. 632-4.
67. Ye, X., et al., *The role of IL-23/Th17 pathway in patients with primary immune thrombocytopenia*. PLoS One, 2015. **10**(1): p. e0117704.
68. Saito, A., et al., *Circulating plasmacytoid dendritic cells in patients with primary and Helicobacter pylori-associated immune thrombocytopenia*. Eur J Haematol, 2012. **88**(4): p. 340-9.

69. Rodeghiero, F., et al., *Standardization of bleeding assessment in immune thrombocytopenia: report from the International Working Group*. Blood, 2013. **121**(14): p. 2596-606.
70. Hill, Q.A. and A.C. Newland, *Fatigue in immune thrombocytopenia*. Br J Haematol, 2015. **170**(2): p. 141-9.
71. Cortelazzo, S., et al., *High risk of severe bleeding in aged patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura*. Blood, 1991. **77**(1): p. 31-3.
72. Rodeghiero, F., *Is ITP a thrombophilic disorder?* Am J Hematol, 2016. **91**(1): p. 39-45.
73. Ruggeri, M. and F. Rodeghiero, *Thrombotic risk in patients with immune haemolytic anaemia*. Br J Haematol, 2016. **172**(1): p. 144-6.
74. Lozano, M.L., et al., *Real-life management of primary immune thrombocytopenia (ITP) in adult patients and adherence to practice guidelines*. Ann Hematol, 2016. **95**(7): p. 1089-98.
75. Li, Z., et al., *Low-dose rituximab combined with short-term glucocorticoids up-regulates Treg cell levels in patients with immune thrombocytopenia*. Int J Hematol, 2011. **93**(1): p. 91-8.
76. Li, J., et al., *Effects of rapamycin combined with low dose prednisone in patients with chronic immune thrombocytopenia*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 548085.
77. Cines, D.B. and V.S. Blanchette, *Immune thrombocytopenic purpura*. N Engl J Med, 2002. **346**(13): p. 995-1008.
78. Matschke, J., et al., *A Randomized Trial of Daily Prednisone versus Pulsed Dexamethasone in Treatment-Naïve Adult Patients with Immune Thrombocytopenia: EIS 2002 Study*. Acta Haematol, 2016. **136**(2): p. 101-7.
79. Wei, Y., et al., *High-dose dexamethasone vs prednisone for treatment of adult immune thrombocytopenia: a prospective multicenter randomized trial*. Blood, 2016. **127**(3): p. 296-302; quiz 370.
80. Imbach, P., A.H. Lazarus, and T. Kuhne, *Intravenous immunoglobulins induce potentially synergistic immunomodulations in autoimmune disorders*. Vox Sang, 2010. **98**(3 Pt 2): p. 385-94.
81. Ephrem, A., et al., *Expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: a critical factor in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis*. Blood, 2008. **111**(2): p. 715-22.
82. Dussault, N., et al., *Immunomodulation of human B cells following treatment with intravenous immunoglobulins involves increased phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*. Int Immunol, 2008. **20**(11): p. 1369-79.
83. Gilardin, L., J. Bayry, and S.V. Kaveri, *Intravenous immunoglobulin as clinical immune-modulating therapy*. CMAJ, 2015. **187**(4): p. 257-64.
84. Godeau, B., et al., *Intravenous immunoglobulin for adults with autoimmune thrombocytopenic purpura: results of a randomized trial comparing 0.5 and 1 g/kg b.w.* Br J Haematol, 1999. **107**(4): p. 716-9.



85. Benesch, M., et al., *Low-dose versus high-dose immunoglobulin for primary treatment of acute immune thrombocytopenic purpura in children: results of a prospective, randomized single-center trial.* J Pediatr Hematol Oncol, 2003. **25**(10): p. 797-800.
86. Zhou, Z., et al., *Different dosages of intravenous immunoglobulin (IVIg) in treating immune thrombocytopenia with long-term follow-up of three years: Results of a prospective study including 167 cases.* Autoimmunity, 2016. **49**(1): p. 50-7.
87. Mayer, B., et al., *New aspects on the efficacy of high-dose intravenous immunoglobulins in patients with autoimmune thrombocytopenia.* Vox Sang, 2017. **112**(1): p. 64-69.
88. Nieswandt, B. and S. Stritt, *Megakaryocyte rupture for acute platelet needs.* J Cell Biol, 2015. **209**(3): p. 327-8.
89. Vianelli, N., et al., *Splenectomy as a curative treatment for immune thrombocytopenia: a retrospective analysis of 233 patients with a minimum follow up of 10 years.* Haematologica, 2013. **98**(6): p. 875-80.
90. Fabris, F., et al., *Age as the major predictive factor of long-term response to splenectomy in immune thrombocytopenic purpura.* Br J Haematol, 2001. **112**(3): p. 637-40.
91. Kumar, S., et al., *Splenectomy for immune thrombocytopenic purpura: long-term results and treatment of postsplenectomy relapses.* Ann Hematol, 2002. **81**(6): p. 312-9.
92. Kojouri, K., et al., *Splenectomy for adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: a systematic review to assess long-term platelet count responses, prediction of response, and surgical complications.* Blood, 2004. **104**(9): p. 2623-34.
93. Aleem, A., *Durability and factors associated with long term response after splenectomy for primary immune thrombocytopenia (ITP) and outcome of relapsed or refractory patients.* Platelets, 2011. **22**(1): p. 1-7.
94. Shojaiefard, A., et al., *Prediction of response to splenectomy in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura.* World J Surg, 2008. **32**(3): p. 488-93.
95. Guan, Y., et al., *Long-term results of splenectomy in adult chronic immune thrombocytopenia.* Eur J Haematol, 2017. **98**(3): p. 235-241.
96. Anguita, E., et al., *Splenectomy in ITP: we keep removing a healthy functional organ.* Ann Hematol, 2016. **95**(11): p. 1911-2.
97. Moulis, G., et al., *Need for an improved vaccination rate in primary immune thrombocytopenia patients exposed to rituximab or splenectomy. A nationwide population-based study in France.* Am J Hematol, 2015. **90**(4): p. 301-5.
98. Kristinsson, S.Y., et al., *Long-term risks after splenectomy among 8,149 cancer-free American veterans: a cohort study with up to 27 years follow-up.* Haematologica, 2014. **99**(2): p. 392-8.
99. Thai, L.H., et al., *Long-term complications of splenectomy in adult immune thrombocytopenia.* Medicine (Baltimore), 2016. **95**(48): p. e5098.
100. Ahmed, R., et al., *Long-term outcome following splenectomy for chronic and persistent immune thrombocytopenia (ITP) in adults and children : Splenectomy in ITP.* Ann Hematol, 2016. **95**(9): p. 1429-34.

101. Palandri, F., et al., *Have splenectomy rate and main outcomes of ITP changed after the introduction of new treatments? A monocentric study in the outpatient setting during 35 years*. Am J Hematol, 2016. **91**(4): p. E267-72.
102. Bassier, R.L., et al., *Development of pancytopenia with neutralizing antibodies to thrombopoietin after multicycle chemotherapy supported by megakaryocyte growth and development factor*. Blood, 2002. **99**(7): p. 2599-602.
103. Bao, W., et al., *Improved regulatory T-cell activity in patients with chronic immune thrombocytopenia treated with thrombopoietic agents*. Blood, 2010. **116**(22): p. 4639-45.
104. Liu, X.G., et al., *Thrombopoietin receptor agonists shift the balance of Fcγ receptors toward inhibitory receptor IIb on monocytes in ITP*. Blood, 2016. **128**(6): p. 852-61.
105. Kuter, D.J., et al., *Long-term treatment with romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenia: safety and efficacy*. Br J Haematol, 2013. **161**(3): p. 411-23.
106. Steurer, M., et al., *A large observational study of patients with primary immune thrombocytopenia receiving romiplostim in European clinical practice*. Eur J Haematol, 2017. **98**(2): p. 112-120.
107. Khellaf, M., et al., *Romiplostim safety and efficacy for immune thrombocytopenia in clinical practice: 2-year results of 72 adults in a romiplostim compassionate-use program*. Blood, 2011. **118**(16): p. 4338-45.
108. Kuter, D.J., et al., *Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomised controlled trial*. Lancet, 2008. **371**(9610): p. 395-403.
109. Newland, A., et al., *Remission and platelet responses with romiplostim in primary immune thrombocytopenia: final results from a phase 2 study*. Br J Haematol, 2016. **172**(2): p. 262-73.
110. Khellaf, M., et al., *A retrospective pilot evaluation of switching thrombopoietic receptor-agonists in immune thrombocytopenia*. Haematologica, 2013. **98**(6): p. 881-7.
111. Gonzalez-Porras, J.R., et al., *Use of eltrombopag after romiplostim in primary immune thrombocytopenia*. Br J Haematol, 2015. **169**(1): p. 111-6.
112. Bussel, J.B., et al., *Case study of remission in adults with immune thrombocytopenia following cessation of treatment with the thrombopoietin mimetic romiplostim*. Hematology, 2016. **21**(4): p. 257-62.
113. Mahevas, M., et al., *The temporary use of thrombopoietin-receptor agonists may induce a prolonged remission in adult chronic immune thrombocytopenia. Results of a French observational study*. Br J Haematol, 2014. **165**(6): p. 865-9.
114. Gonzalez-Lopez, T.J., et al., *Sustained response after discontinuation of short-and medium-term treatment with eltrombopag in patients with immune thrombocytopenia*. Platelets, 2015. **26**(1): p. 83-6.

115. Gonzalez-Lopez, T.J., et al., *Successful discontinuation of eltrombopag after complete remission in patients with primary immune thrombocytopenia*. Am J Hematol, 2015. **90**(3): p. E40-3.
116. Bussel, J.B., et al., *Tapering eltrombopag in patients with chronic ITP: How successful is this and in whom does it work?* Blood, 2015. **126**(23): p. 1054
117. Rudnicka, D., et al., *Rituximab causes a polarization of B cells that augments its therapeutic function in NK-cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity*. Blood, 2013. **121**(23): p. 4694-702.
118. Stasi, R., et al., *Response to B-cell depleting therapy with rituximab reverts the abnormalities of T-cell subsets in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura*. Blood, 2007. **110**(8): p. 2924-30.
119. Arnold, D.M., et al., *Systematic review: efficacy and safety of rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura*. Ann Intern Med, 2007. **146**(1): p. 25-33.
120. Stasi, R., et al., *Variable patterns of response to rituximab treatment in adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3872-3.
121. Zaja, F., et al., *Lower dose rituximab is active in adults patients with idiopathic thrombocytopenic purpura*. Haematologica, 2008. **93**(6): p. 930-3.
122. Zaja, F., et al., *Low-dose rituximab in adult patients with primary immune thrombocytopenia*. Eur J Haematol, 2010. **85**(4): p. 329-34.
123. Provan, D., et al., *Activity and safety profile of low-dose rituximab for the treatment of autoimmune cytopenias in adults*. Haematologica, 2007. **92**(12): p. 1695-8.
124. Mahevas, M., et al., *Efficacy and safety of rituximab given at 1,000 mg on days 1 and 15 compared to the standard regimen to treat adult immune thrombocytopenia*. Am J Hematol, 2013. **88**(10): p. 858-61.
125. Zaja, F., et al., *Dexamethasone plus rituximab yields higher sustained response rates than dexamethasone monotherapy in adults with primary immune thrombocytopenia*. Blood, 2010. **115**(14): p. 2755-62.
126. Bussel, J.B., et al., *Rituximab and three dexamethasone cycles provide responses similar to splenectomy in women and those with immune thrombocytopenia of less than two years duration*. Haematologica, 2014. **99**(7): p. 1264-71.
127. Marangon, M., et al., *Rituximab in immune thrombocytopenia: gender, age, and response as predictors of long-term response*. Eur J Haematol, 2017. **98**(4): p. 371-377.
128. Rashidi, A. and M.A. Blinder, *Combination therapy in relapsed or refractory chronic immune thrombocytopenia: a case report and literature review*. J Clin Pharm Ther, 2016. **41**(5): p. 453-8.
129. Grozovsky, R., et al., *Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond*. Blood, 2015. **126**(16): p. 1877-84.

130. Zeng, Q., et al., *Relative efficacy of steroid therapy in immune thrombocytopenia mediated by anti-platelet GPIIb/IIIa versus GPIIb/IIIa antibodies*. Am J Hematol, 2012. **87**(2): p. 206-8.
131. Grewal, P.K., et al., *The Ashwell receptor mitigates the lethal coagulopathy of sepsis*. Nat Med, 2008. **14**(6): p. 648-55.
132. Shao, L., et al., *Successful treatment with oseltamivir phosphate in a patient with chronic immune thrombocytopenia positive for anti-GPIIb/IX autoantibody*. Platelets, 2015. **26**(5): p. 495-7.
133. Alvarez-Roman, M.T., et al., *Thrombopoietin receptor agonists in conjunction with oseltamivir for immune thrombocytopenia*. AIDS, 2016. **30**(7): p. 1141-2.
134. Neunert, C., et al., *The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia*. Blood, 2011. **117**(16): p. 4190-207.
135. Sanz, M.A., et al., *[Guidelines for diagnosis, treatment and monitoring of primary immune thrombocytopenia]*. Med Clin (Barc), 2012. **138**(6): p. 261 e1-261 e17.
136. Hayashi, S., et al., *[Reticulated platelet determination: methodologies and applications for the evaluation of thrombocytopenic disorders]*. Rinsho Ketsueki, 1999. **40**(3): p. 205-12.
137. Hemker, H.C., et al., *The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma*. Thromb Haemost, 2000. **83**(4): p. 589-91.
138. Morel, O., et al., *Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors*. Curr Opin Hematol, 2004. **11**(3): p. 156-64.
139. Freyssinet, J.M., *Cellular microparticles: what are they bad or good for?* J Thromb Haemost, 2003. **1**(7): p. 1655-62.
140. Provan, D. and A.C. Newland, *Current Management of Primary Immune Thrombocytopenia*. Adv Ther, 2015. **32**(10): p. 875-87.
141. Martin, M., et al., *Platelet apoptosis and agonist-mediated activation in myelodysplastic syndromes*. Thromb Haemost, 2013. **109**(5): p. 909-19.
142. Kosugi, S., et al., *Circulating thrombopoietin level in chronic immune thrombocytopenic purpura*. Br J Haematol, 1996. **93**(3): p. 704-6.
143. Ichikawa, N., et al., *Changes in serum thrombopoietin levels after splenectomy*. Acta Haematol, 1998. **100**(3): p. 137-41.
144. Monteagudo, M., et al., *[Relationship between reticulated platelets and megacaryocyte number in thrombocytopenic patients]*. Med Clin (Barc), 2009. **133**(3): p. 81-5.
145. Cesari, F., et al., *Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy*. Thromb Haemost, 2008. **99**(5): p. 930-5.
146. Monteagudo, M., et al., *Reticulated platelets as a screening test to identify thrombocytopenia aetiology*. QJM, 2008. **101**(7): p. 549-55.

147. Arellano-Rodrigo, E., *[Role of reticulated platelets in the clinical evaluation of thrombocytopoiesis]*. Med Clin (Barc), 2009. **133**(3): p. 95-7.
148. Thomas-Kaskel, A.K., et al., *Reticulated platelet counts correlate with treatment response in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and help identify the complex causes of thrombocytopenia in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Cytometry B Clin Cytom, 2007. **72**(4): p. 241-8.
149. Gu, D., et al., *Raised expression of APRIL in Chinese patients with immune thrombocytopenia and its clinical implications*. Autoimmunity, 2009. **42**(8): p. 692-8.
150. Dillon, S.R., et al., *B-lymphocyte stimulator/a proliferation-inducing ligand heterotrimers are elevated in the sera of patients with autoimmune disease and are neutralized by atacicept and B-cell maturation antigen-immunoglobulin*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(2): p. R48.
151. Gozmen, S., et al., *B-cell-activating factor, a proliferation inducing ligand and co-stimulatory molecules in the pathogenesis of immune thrombocytopenia in childhood*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2016. **27**(5): p. 494-9.
152. Psaila, B., et al., *Differences in platelet function in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia compared to equally thrombocytopenic patients with immune thrombocytopenia: a reply to a rebuttal*. J Thromb Haemost, 2013. **11**(5): p. 1002-3.
153. Frelinger, A.L., 3rd, et al., *Platelet function tests, independent of platelet count, are associated with bleeding severity in ITP*. Blood, 2015. **126**(7): p. 873-9.
154. Stasi, R., et al., *Idiopathic thrombocytopenic purpura: current concepts in pathophysiology and management*. Thromb Haemost, 2008. **99**(1): p. 4-13.
155. Schoenwaelder, S.M., et al., *Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetics can induce a transient thrombocytopathy that undermines the hemostatic function of platelets*. Blood, 2011. **118**(6): p. 1663-74.
156. Melki, I., et al., *Platelet microvesicles in health and disease*. Platelets, 2017. **28**(3): p. 214-221.
157. Owens, A.P., 3rd and N. Mackman, *Microparticles in hemostasis and thrombosis*. Circ Res, 2011. **108**(10): p. 1284-97.
158. Vasina, E.M., et al., *Aging- and activation-induced platelet microparticles suppress apoptosis in monocytic cells and differentially signal to proinflammatory mediator release*. Am J Blood Res, 2013. **3**(2): p. 107-23.
159. Goette, N.P., et al., *Platelet Apoptosis in Adult Immune Thrombocytopenia: Insights into the Mechanism of Damage Triggered by Auto-Antibodies*. PLoS One, 2016. **11**(8): p. e0160563.
160. Lacroix, R. and F. Dignat-George, *Microparticles as a circulating source of procoagulant and fibrinolytic activities in the circulation*. Thromb Res, 2012. **129** Suppl 2: p. S27-9.
161. Sewify, E.M., et al., *Increased circulating red cell microparticles (RMP) and platelet microparticles (PMP) in immune thrombocytopenic purpura*. Thromb Res, 2013. **131**(2): p. e59-63.

162. Alvarez-Roman, M.T., et al., *Procoagulant profile in patients with immune thrombocytopenia*. Br J Haematol, 2016. **175**(5): p. 925-934.
163. Bouchard, B.A., et al., *Platelets do not express the oxidized or reduced forms of tissue factor*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(3): p. 1188-93.
164. Bouchard, B.A., K.G. Mann, and S. Butenas, *No evidence for tissue factor on platelets*. Blood, 2010. **116**(5): p. 854-5.
165. Jy, W., et al., *Red cell-derived microparticles (RMP) as haemostatic agent*. Thromb Haemost, 2013. **110**(4): p. 751-60.
166. Kappers-Klunne, M.C., et al., *Serum thrombopoietin levels in relation to disease status in patients with immune thrombocytopenic purpura*. Br J Haematol, 2001. **115**(4): p. 1004-6.
167. Hoffmann, J.J., *Reticulated platelets: analytical aspects and clinical utility*. Clin Chem Lab Med, 2014. **52**(8): p. 1107-17.
168. Leven, E., et al., *Successful discontinuation of eltrombopag treatment in patients with chronic ITP*. Blood, 2012. **120**(21): p. 1085.
169. Psaila, B., et al., *In vivo effects of eltrombopag on platelet function in immune thrombocytopenia: no evidence of platelet activation*. Blood, 2012. **119**(17): p. 4066-72.
170. Panzer, S., et al., *Agonist-inducible platelet activation in chronic idiopathic autoimmune thrombocytopenia*. Eur J Haematol, 2007. **79**(3): p. 198-204.
171. Panzer, S., et al., *Platelet function to estimate the bleeding risk in autoimmune thrombocytopenia*. Eur J Clin Invest, 2007. **37**(10): p. 814-9.
172. Alvarez Roman, M., et al., *Procoagulant profile of platelets from immune thrombocytopenia patients*. Blood, 2016. **128**(22): p. 1370.
173. Rodeghiero, F. and G. Carli, *Beyond immune thrombocytopenia: the evolving role of thrombopoietin receptor agonists*. Ann Hematol, 2017.
174. Marie, I., et al., *Intravenous immunoglobulin-associated arterial and venous thrombosis; report of a series and review of the literature*. Br J Dermatol, 2006. **155**(4): p. 714-21.
175. Ghanima, W., et al., *Venous thromboembolism and coagulation activity in patients with immune thrombocytopenia treated with thrombopoietin receptor agonists*. Br J Haematol, 2012. **158**(6): p. 811-4.
176. Dielis, A.W., et al., *Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(1): p. 125-31.
177. Alvarez Roman, M.T., et al., *Effect of thrombopoietin-receptor agonists on a proliferation-inducing ligand (APRIL) plasma levels in patients with immune thrombocytopaenia*. Br J Clin Pharmacol, 2014. **78**(3): p. 674-6.
178. George-Chandy, A., E. Trysberg, and K. Eriksson, *Raised intrathecal levels of APRIL and BAFF in patients with systemic lupus erythematosus: relationship to neuropsychiatric symptoms*. Arthritis Res Ther, 2008. **10**(4): p. R97.

179. Li, M.O., S. Sanjabi, and R.A. Flavell, *Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms*. Immunity, 2006. **25**(3): p. 455-71.
180. van Leeuwen, E.F., et al., *Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia*. Blood, 1982. **59**(1): p. 23-6.
181. McMillan, R., L. Wang, and P. Tani, *Prospective evaluation of the immunobead assay for the diagnosis of adult chronic immune thrombocytopenic purpura (ITP)*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(3): p. 485-91.
182. Webster, M.L., et al., *Relative efficacy of intravenous immunoglobulin G in ameliorating thrombocytopenia induced by antiplatelet GPIIb/IIIa versus GPIbalph antibodies*. Blood, 2006. **108**(3): p. 943-6.
183. Peng, J., et al., *Association of autoantibody specificity and response to intravenous immunoglobulin G therapy in immune thrombocytopenia: a multicenter cohort study*. J Thromb Haemost, 2014. **12**(4): p. 497-504.
184. Kaplan, C., *Toddy for chilled platelets?* Blood, 2012. **119**(5): p. 1100-2.
185. Li, J., et al., *Severe platelet desialylation in a patient with glycoprotein Ib/IX antibody-mediated immune thrombocytopenia and fatal pulmonary hemorrhage*. Haematologica, 2014. **99**(4): p. e61-3.
186. Alioglu, B., et al., *An experience of oseltamivir phosphate (tamiflu) in a pediatric patient with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: a case report*. Pathophysiol Haemost Thromb, 2010. **37**(2-4): p. 55-8.
187. Lee, C.Y., et al., *Acute immune thrombocytopenic purpura in an adolescent with 2009 novel H1N1 influenza A virus infection*. J Chin Med Assoc, 2011. **74**(9): p. 425-7.

## **9.PUBLICACIONES**



## Immune thrombocytopenia – in defence of the platelet count. Response to Hill

The aim of our recently published paper (Alvarez-Roman *et al*, 2016) was not to underestimate the importance of the platelet count but to understand which mechanisms may be involved in the unexpected mild bleeding phenotype observed in some patients with immune thrombocytopenia (ITP) despite the very low platelet counts that, in other clinical contexts, might lead to haemorrhagic manifestations.

In this work, we showed that increased amount of microparticles, resistance to protein C and hypofibrinolysis are mechanisms that, among others described previously (Kim *et al*, 2015), might not only protect ITP patients from bleeding but also contribute to the prothrombotic state observed in the disease.

On the basis of these findings, the possible synergistic effect of the sustained increase in platelet counts due to therapeutic approaches and the prothrombotic background present in ITP patients might increase the risk of thrombosis in some patients. In these scenarios, lack of studies and specific assays to predict risk of thrombosis might complicate therapeutic intervention. In such cases, considering only platelet counts may be simplistic, leading to an incomplete picture of haemostasis in ITP patients under treatment.

Many patients with ITP, even in the setting of severe thrombocytopenia, do not exhibit significant bleeding, showing that correlation between low platelet counts and bleeding might be, at least, controversial (Neunert *et al*, 2015).

Moreover, as in other autoimmune diseases, patients with ITP have a particularly high risk of suffering hypercoagulable disorders (Zoller *et al*, 2012). In a recent study which avoided selection bias, Norgaard *et al* (2016) confirmed the higher incidence of thrombotic/thromboembolic events in a Scandinavian population-based cohort of adults with chronic ITP, of whom 70% of them were considered to have a low comorbidity burden. On the other hand, Boyle *et al* (2013) studied a cohort of 9976 ITP patients, 17.7% of them treated with splenectomy, which increased the risk of abdominal venous thromboembolism (1.6% vs. 1%) and venous thromboembolism (4.3% vs. 1.7%) when compared with patients who did not undergo splenectomy. Results from clinical trials performed with ITP patients receiving agonists to thrombopoietin receptor showed increased risk of experiencing

venous and arterial thrombosis (Rodeghiero, 2016). Therefore, synergies among therapeutic approaches and individual circumstances, such as age and comorbidities, might condition the development of a thrombotic event.

Regarding the use of thromboelastography to predict thrombotic events in patients with ITP, we agree with Dr. Hill that more studies have to be performed to determine its utility in this field. Nevertheless, considering the value of thromboelastography for evaluating haemostasis in trauma patients (Veigas *et al*, 2016), major non-cardiac surgery and liver disease (Shin *et al*, 2017) among other situations, we recommend its use to determine haemostasis in ITP patients with a sustained increase in platelet count.

Perhaps thrombotic events have less impact on mortality than bleeding (Norgaard *et al*, 2011) in ITP patients, but they may complicate ITP management and patient quality of life. Consequently, we must endeavour to avoid/predict their occurrence.

### Author contributions

MTAR and IFB collected and verified references included and gave insight/advice regarding their respective areas of expertise. NVB was the principal investigator and wrote the letter. All authors discussed and reviewed the letter.

**María T. Álvarez Román**<sup>1</sup>

**Ihosvany Fernández Bello**<sup>1</sup>


**Víctor Jiménez-Yuste**<sup>1,2</sup>

**Mónica Martín Salces**<sup>1</sup>

**Elena G. Arias-Salgado**<sup>3</sup>

**María I. Rivas Pollmar**<sup>1</sup>

**Raúl Justo Sanz**<sup>1</sup>

**Nora V. Butta**<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Hematology and Hemotherapy Unit, University Hospital La Paz-IdiPaz, Madrid, Spain, <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, and <sup>3</sup>Advanced Medical Projects Madrid, Madrid, Spain

E-mail: nora.butta@salud.madrid.org

MTAR and IFB contributed equally to the work.

**Keywords:** immune thrombocytopenia, thromboelastometry, platelet count, thrombopoietin-receptor agonists, thrombosis

## References

- Alvarez-Roman, M.T., Fernandez-Bello, I., Jimenez-Yuste, V., Martin-Salces, M., Arias-Salgado, E.G., Rivas Pollmar, M.J., Justo Sanz, R. & Butta, N.V. (2016) Procoagulant profile in patients with immune thrombocytopenia. *British Journal of Haematology*, **175**, 925–934.
- Boyle, S., White, R.H., Brunson, A. & Wun, T. (2013) Splenectomy and the incidence of venous thromboembolism and sepsis in patients with immune thrombocytopenia. *Blood*, **121**, 4782–4790.
- Kim, W.H., Park, J.B., Jung, C.W. & Kim, G.S. (2015) Rebalanced hemostasis in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Platelets*, **26**, 38–42.
- Neunert, C., Noroszi, N., Norman, G., Buchanan, G.R., Goy, J., Nazi, I., Kelton, J.G. & Arnold, D.M. (2015) Severe bleeding events in adults and children with primary immune thrombocytopenia: a systematic review. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **13**, 457–464.
- Norgaard, M., Jensen, A.O., Ingebjerg, M.C., Farakas, D.K., Thomsen, R.W., Cha, S., Zhao, S. & Sorensen, H.T. (2011) Long-term clinical outcomes of patients with primary chronic immune thrombocytopenia: a Danish population-based cohort study. *Blood*, **117**, 3514–3520.
- Norgaard, M., Cetin, K., Maeghke, M.J., Kristensen, N.R., Ghanima, W., Bahmanyar, S., Stryker, S. & Christiansen, C.F. (2016) Risk of arterial thrombotic and venous thromboembolic events in patients with primary chronic immune thrombocytopenia: a Scandinavian population-based cohort study. *British Journal of Haematology*, **174**, 639–642.
- Rodeghiero, F. (2016) Is ITP a thrombophilic disorder? *American Journal of Hematology*, **91**, 39–45.
- Shin, K.H., Kim, I.S., Lee, H.J., Kim, H.H., Chang, C.J., Hong, Y.M., Yoon, K.T. & Cho, M. (2017) Thromboelastographic evaluation of coagulation in patients with liver disease. *Annals of Laboratory Medicine*, **37**, 204–212.
- Veigas, P.V., Callum, J., Rizoli, S., Nascimento, B. & da Luz, L.T. (2016) A systematic review on the rotational thrombelastometry (ROTEM(R)) values for the diagnosis of coagulopathy, prediction and guidance of blood transfusion and prediction of mortality in trauma patients. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*, **24**, 114.
- Zoller, B., Li, X., Sundquist, J. & Sundquist, K. (2012) Risk of pulmonary embolism in patients with autoimmune disorders: a nationwide follow-up study from Sweden. *Lancet*, **379**, 244–249.

# Correspondence

AIDS 2016, 30:1141–1146

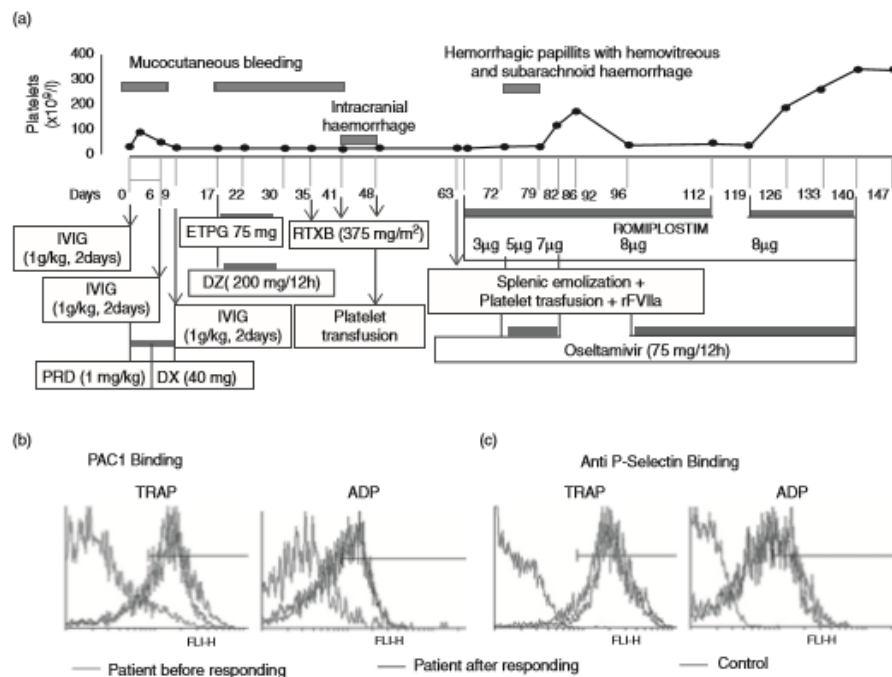
## Thrombopoietin receptor agonists in conjunction with oseltamivir for immune thrombocytopenia

We present a case of a HIV-positive patient with immune thrombocytopenia (ITP) refractory to treatment with intravenous immunoglobulin (IVIg) and corticosteroids, as well as to several second-line treatments. Complete response was achieved with the combination of a thrombopoietin receptor agonist (TPORA) and the neuraminidase inhibitor oseltamivir.

A 51-year-old man presented mucocutaneous hemorrhaging 24 h after onset. His platelet count was  $7 \times 10^9/l$  with leukocytes and hemoglobin within normal ranges. A peripheral blood smear showed neither schistocytes nor dysplastic features. The medical history indicated

HCV treated to an undetectable viral load, and an HIV infection since 1988, with the patient currently undergoing antiretroviral treatment with tenofovir disoproxil difumarate, raltegravir and efavirenz. He also had dyslipidemia secondary to the antiretroviral treatment under good control and type 2 diabetes mellitus secondary to pentamidine and was on insulin treatment.

In the last check-up 10 days before the hospitalization, the patient presented a CD4<sup>+</sup> level of 26% (447 cells/ $\mu$ l) and an undetectable viral load. Thrombocytopenia in patients with HIV infection is usually mild, and lower



**Fig. 1. (a) Platelet count, bleeding episodes and therapeutic treatments along time.** Arrows indicate single therapeutic interventions and green lines periods receiving drug treatments. (b and c) Surface expression of platelet activation markers evaluated by flow cytometry. Platelets from healthy controls and from the patient before and after responding to treatment were stimulated with TRAP (PAR-1 receptor agonist) and ADP and the binding of FITC-PAC1, antibody that recognizes the activated conformation of fibrinogen receptor (b) and FITC-anti-P-selectin antibody were assayed (c). DX, dexamethasone; DZ, danazol; ETPG, eltrombopag; PRD, prednisone; RTX, rituximab.

counts usually occur in advanced stages of the disease, with CD4<sup>+</sup> cell counts below 200 cells/ $\mu$ L. It is therefore unlikely that this thrombocytopenia was secondary to the HIV infection.

ITP is an autoimmune disease mediated by antibodies against platelet membrane glycoproteins (GP). Platelet destruction mechanism differs according to the GP against which the antibodies are directed. Antibodies against GPIIb/IIIa caused opsonization of platelets that are destroyed through the binding of the constant fraction of immunoglobulins to their receptors present in the spleen macrophages. Antibodies against GPIb/IX [1–3] produce a translocation of the neuraminidase from the granules to platelet surface, which causes a loss of sialic acid in the GPIb/IX. These platelets without sialic acid are taken up by the Ashwell–Morell receptors of the hepatocytes, where they are destroyed [4,5]. This is significant from the therapeutic standpoint, because, when the destruction is independent of the binding to the Fc receptor for immunoglobulin, the blocking of this receptor with IVIG will be ineffective.

Patient platelet count and therapeutic treatments along time are shown in Fig. 1a. Up to 40–70% of patients with ITP respond to first-line corticosteroid treatment; however, our case did not and showed hemorrhagic symptoms. We started second-line treatment in the persistent ITP phase with the TPORA eltrombopag because recent studies have shown higher response rates (up to 93%) when the agonist treatment is started in persistent ITP. Owing to the lack of response, we started treatment with the anti-CD20 monoclonal antibody because of the diagnostic suspicion of a splenic lymphoma. After three doses of rituximab, the platelet count did not rise, and the patient had WHO grade 3 hemorrhagic symptoms. Owing to the high risk of bleeding, we performed a partial splenic embolization, which also failed to increase platelet count. Although we were unable to perform a platelet kinetics study due to our patient's thrombocytopenia, we believe that there might be a platelet elimination mechanism other than the splenic destruction. Thus, we began treatment with oseltamivir to inhibit neuraminidase, improve the sialylation of platelet membrane GPs and, consequently, avoid platelet interaction with Ashwell–Morell receptors of the hepatocytes. Platelet count only increased after simultaneous treatment of oseltamivir and TPORA.

Few cases have been published on the management of patients with ITP using oseltamivir and none with the combination of this drug and a TPORA as we performed for our patient [6].

In the studies conducted for our patient, oseltamivir restored platelet function (Fig. 1b and c), in contrast to

what occurs in patients treated only with TPORA [7], and slightly improved membrane glycoprotein sialylation (data not shown).

The combined use of a TPORA (romiplostim) which increases platelet production and another (such as oseltamivir) that re-establishes membrane glycoprotein sialylation can be useful for patients with combined splenic and hepatic destruction mechanisms.

## Acknowledgements

This work was supported by a grant from the ISCIII – Feder, PI12/01831 (N.V.B.). N.V.B. holds a Miguel Servet II tenure track grant from FIS.

## Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

**María T. Álvarez-Román<sup>a</sup>, María I. Rivas Pollmar<sup>a</sup>, José I. Bernardino<sup>a</sup>, María L. Lozano<sup>c</sup>, Mónica Martín-Salces<sup>a</sup>, Ihsany Fernández-Bello<sup>a</sup>, Víctor Jiménez-Yuste<sup>a</sup> and Nora V. Butta<sup>a</sup>**, <sup>a</sup>Servicio de Hematología y Hemoterapia, <sup>b</sup>Unidad VII, Hospital Universitario La Paz-IDIPaz, Madrid, and <sup>c</sup>Centro Regional Hemodonación Murcia-IMIB, Hospital Morales Messeguer, Murcia, Spain.

Correspondence to Nora V. Butta, PhD, Hospital Universitario La Paz-Idipaz, Madrid, Spain.

Tel: +34 91 7277000; fax: +34 91 3582211; e-mail: nora.butta@salud.madrid.org

## References

1. Zeng Q, Zhu L, Tao L, Bao J, Yang M, Simpson EK, et al. Relative efficacy of steroid therapy in immune thrombocytopenia mediated by antiplatelet GPIIb/IIIa versus GPIIb/IIIa antibodies. *Am J Hematol* 2012; **87**:206–208.
2. Peng J, Ma SH, Liu J, Hou Y, Liu XM, Niu T, et al. Association of autoantibody specificity and response to intravenous immunoglobulin G therapy in immune thrombocytopenia: a multicenter cohort study. *J Thromb Haemost* 2014; **12**:497–504.
3. Grozovsky R, Giannini S, Falek H, Hoffmeister KM. Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond. *Blood* 2015; **126**:1877–1884.
4. Kaplan C. Toddy for chilled platelets? *Blood* 2012; **119**:1100–1102.
5. Grewal PK, Uchiyama S, Ditto D, Varki N, Le DT, Nizet V, et al. The Ashwell receptor mitigates the lethal coagulopathy of sepsis. *Nat Med* 2008; **14**:648–655.
6. Shao L, Wu Y, Zhou H, Qin P, Ni H, Peng J, et al. Successful treatment with oseltamivir phosphate in a patient with chronic immune thrombocytopenia positive for anti-GPIIb/IX autoantibody. *Platelets* 2015; **26**:495–497.
7. Alvarez Roman MT, Fernández Bello I, Arias-Salgado EG, Rivas Pollmar MI, Jiménez Yuste V, Martín Salces M, et al. Effects of thrombopoietin receptor agonists on procoagulant state in patients with immune thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 2014; **112**:65–72.

DOI:10.1097/QAD.0000000000001036

## Procoagulant profile in patients with immune thrombocytopenia

María T. Álvarez-Román,<sup>1</sup>  
Ihosvany Fernández-Bello,<sup>1</sup>  
Víctor Jiménez-Yuste,<sup>1,2</sup>  
Mónica Martín-Salces,<sup>1</sup> Elena G.  
Arias-Salgado,<sup>3</sup> María I. Rivas Pollmar,<sup>1</sup>  
Raúl Justo Sanz<sup>1</sup> and Nora V. Butta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Haematology and Haemotherapy Unit, University Hospital La Paz-IdiPaz, <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Madrid, and <sup>3</sup>Advanced Medical Projects Madrid, Madrid, Spain

Received 21 June 2016; accepted for publication 11 August 2016

Correspondence: Nora V. Butta, Haematology and Haemotherapy Unit, University Hospital La Paz-IdiPaz, Paseo de la Castellana 261, Madrid 28046, Spain.  
E-mail: nora.butta@salud.madrid.org  
MTAR and IFB contributed equally to the work.

### Summary

Despite their low platelet count some immune thrombocytopenia (ITP) patients seldom bleed, indicating the presence of factors to compensate thrombocytopenia. Moreover, ITP patients may have an increased risk for thrombosis. These facts suggest the presence of procoagulant mechanisms that have not been clarified yet. The aim of this study was to identify these possible factors. Moreover, the utility of rotational thromboelastometry (ROTEM<sup>®</sup>) to test haemostasis in these patients was also evaluated. Patients with ITP presented a procoagulant profile due to an increased amount of platelet- and red cell-microparticles, an increased resistance to protein C and the formation of a clot more resistant to fibrinolysis due to augmented levels of plasminogen activator inhibitor-1, which might reflect an endothelial damage/activation in ITP patients. Despite increased maximum clot firmness and reduced lysis, ROTEM<sup>®</sup> profiles showed a prolonged clotting time that might rely on the presence of anti-platelet antibodies as suggested by the increased lagtime in thrombin generation test caused by plasma from ITP patients on platelets from healthy controls. These results indicate the need to individualize therapeutic treatment for ITP patients, considering their procoagulant profile and the presence of concomitant risk factors. Moreover, ROTEM<sup>®</sup> appeared to be useful for evaluating haemostasis in ITP patients.

**Keywords:** immune thrombocytopenia, thromboelastometry, fibrinolysis, thrombin generation, microparticles.

Immune thrombocytopenia (ITP) is an autoimmune disorder in which involves both increased platelet destruction and insufficient platelet production (Cines *et al*, 2009).

Severe bleeding rarely occurs when the platelet count is greater than  $30 \times 10^9/l$ , usually occurring when the platelet count falls below  $10 \times 10^9/l$ . Nevertheless, patients can have a range of bleeding manifestations, from none to severe, at a similar platelet count (Provan *et al*, 2010).

Despite their low platelet count, some ITP patients seldom bleed, suggesting the presence of additional mechanisms to compensate thrombocytopenia and ameliorate the haemostasis in such patients.

Moreover, patients with ITP have been recognized as being at an increased risk for thrombosis (Provan *et al*, 2010; Doobaree *et al*, 2016), which can reach twice that of healthy control subjects (Norgaard *et al*, 2016). Thrombotic complications could be due to the disease itself (Sarpatwari *et al*,

2010; Norgaard, 2012) as a consequence of ITP therapy (Cheng *et al*, 2011; Lakshmanan & Cuker, 2012) or associated with other diseases, such as antiphospholipid antibody syndrome (Stasi *et al*, 1994; Pierrot-Deseilligny Despujol *et al*, 2008). For example, in a previous study, we observed that an ITP cohort without antecedents of thrombotic events had an increased plasma and microparticle-associated procoagulant profile before and after responding to thrombopoietin receptor agonists (Álvarez Roman *et al*, 2014).

These data indicate that the platelet count is not the only factor to consider when deciding how to treat a patient with ITP, and the global picture of haemostasis should be analysed before choosing a treatment.

Despite the broadly accepted thrombophilic potential of ITP, no robust mechanistic studies have been designed to provide an explanation for this state. The aim of this study was to analyse the possible factors involved in increased

thrombosis risk in patients with ITP. The feasibility of using the coagulation global assay rotational thromboelastometry (ROTEM®) to test haemostasis in these patients was also evaluated.

## Materials and methods

### Subjects

A total of 42 patients with chronic ITP, as defined by Rodeghiero *et al* (2009), with a mean age of  $59 \pm 17$  years and with a platelet count less than  $50 \times 10^9/l$  were recruited between January 2014 and December 2015. Thirty-five healthy subjects (59% women, mean age of  $55 \pm 23$  years) were also included in the study.

Patients with uncontrolled hypertension, peripheral or coronary artery disease, abnormal hepatic or renal function tests, a diagnosis of a bleeding disorder or thrombopathy, treatment with drugs that could affect haemostasis or a history of thrombotic episodes were excluded.

The La Paz University Hospital Ethics Committee approved the study protocol. The research was performed in compliance with the Helsinki Declaration, after receiving a signed patient informed consent form.

The bleeding score was assessed with the World Health Organization (WHO) Bleeding Scale, which has been validated as the standardized method of recording bleeding for patients with chronic ITP across research studies and in clinical practice (Fogarty *et al*, 2012).

The platelet counts were determined with a Coulter Ac Tdiff cell counter (Beckman Coulter, Madrid, Spain).

The human peripheral blood samples were collected in 3.8% sodium citrate. For platelet-rich plasma (PRP) whole blood was centrifuged at 152 g for 10 min at 23°C and for platelet-poor plasma (PPP) at 1500 g for 15 min at 23°C followed by two additional centrifugations (first: 15 min at 1500 g; second: 2 min at 13 000 g).

Platelet-poor plasma aliquots were stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis. All of the samples were analysed or stored properly within 2 h of sampling.

### Determination of platelet activation

All of the samples were analysed within 30–90 min of blood collection.

Platelet-rich plasma was diluted 1:5 with HEPES buffer (10 mmol/l HEPES, 145 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl and 1 mmol/l  $\text{MgSO}_4$ , pH 7.4) and incubated with 100  $\mu\text{mol/l}$  thrombin receptor-activating peptide 6 (TRAP; Bachem, Bubendorf, Switzerland) at room temperature (RT). Following incubation, fluorescein-isothiocyanate (FITC)-PAC1 (BD Biosciences, Madrid, Spain), a monoclonal antibody (mAb) that recognizes activated conformation of fibrinogen receptors, or FITC-labelled anti-human P-selectin mAb (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) was added for 15 min at

RT in the dark. After incubation, the platelets were diluted in HEPES buffer for flow cytometry analysis with a FACScan flow cytometer (BD Biosciences) and 10 000 events in the platelet region were acquired and analysed with BD Cell-Quest Pro™ software (BD Biosciences).

### Determination of microparticle and plasma procoagulant activities

Microparticle (MP) procoagulant activity was determined with the ZYMUPHEN MP-Activity kit (HYPHEN BioMed, Neuville-sur-Oise, France). This kit is based on a prothrombinase assay after MP capture on a micro-titration plate coated with streptavidin and biotinylated annexin V.

The identification of the MP's cellular origin was determined by flow cytometry, labelling MPs with Annexin-V-FITC and the following specific mAb conjugated with phycoerythrin: anti-CD41 mAb for platelets (Biocytex, Marseille, France); anti-CD14 mAb for monocytes, anti-CD144 mAb for endothelial cells, anti-CD235 mAb for red cells and anti-CD45 mAb for leucocytes, all from BD Biosciences.

### Rotational thromboelastometry

ROTEM® (Pentapharm, Munich, Germany) is a viscoelastic clotting test that measures the kinetics of clot formation and fibrinolysis, providing global information on cellular and soluble procoagulant/anticoagulant protein interactions. ROTEM was performed on fresh PRP adjusted to  $25 \times 10^9$  platelets/l with the subjects own PPP. The samples were allowed to rest at RT for 30 min before testing. Recalcification (via non-activated thromboelastometry; NATEM) was performed to assess the kinetics of clot formation. Clotting time (CT = time from start of measurement until initiation of clotting, in seconds); clot formation time (CFT = time from initiation of clotting to 20 mm amplitude, in seconds, which reflects the speed of the clotting process); alpha angle (tangent to the curve at 2 mm amplitude, in degrees, which reflects the rate of fibrin polymerization); amplitude at "x" time (Ax, in mm); maximum clot firmness (MCF = maximum clot firmness, in mm, which reflects the maximum tensile strength of the thrombus); and lysis at 60 min (LI60) were recorded.

### Calibrated automated thrombogram (CAT)

Thrombin generation was measured in PPP by CAT as described previously (Hemker *et al*, 2003). Coagulation was triggered by proper recalcification and the addition (final concentrations) of 1 pmol/l of recombinant human tissue factor and 4  $\mu\text{mol/l}$  of phospholipid mixture (PPP-Reagent LOW; Thrombinoscope BV, Maastricht, Netherlands). Lag-time (= time when 10 nmol/l thrombin is formed); time-to-peak (TTP = time to reach the maximum thrombin concentration); peak height (PH = maximum thrombin



concentration reached); and endogenous thrombin potential (ETP = area under the thrombin-concentration-vs-time curve) were calculated with the Thrombinoscope software package (Thrombinoscope BV).

To test resistance to protein C, CAT experiments were performed with and without the addition of thrombomodulin (TM) (PPP with TM reagents and PPP alone; Thrombinoscope BV). The results were expressed as the ratio [(ETP with TM)/(ETP without ETP)]  $\times$  100.

The effect of plasma from the patients with ITP on thrombin generation of healthy control platelets was tested. To do so, washed platelets were prepared by collecting and centrifuging (650 g for 10 min at 23°C) the top two-thirds volumes of PRP from controls after the addition of acid-citrate-dextrose (ACD, 1:10). Platelets were resuspended in HEPES buffer, pooled and divided in to aliquots containing  $25 \times 10^6$  platelets which were additionally centrifuged (650 g for 3 min) after adding ACD 1:10. The platelet pellet was resuspended in 1 ml of PPP from controls, patients with ITP or patients with lupus anticoagulant antibodies (LACs). Coagulation was triggered by platelet stimulation with 100  $\mu$ mol/l TRAP.

#### Coagulation factors, lupus anticoagulant factors and proteins involved in fibrinolysis

Diluted Russell viper venom time (dRVVT, LA 1; Siemens, Madrid, Spain) and silica clotting time (SCT) (Instrumentation Laboratory, Madrid, Spain) were used as screening assays for LACs (ACL TOP 700; Beckman Coulter). Test results from samples with prolonged screening were further analysed via mixing and confirmation tests (LA 2 and SCT), as previously described (Arnout, 2001).

Fibrinogen was determined by the Clauss method (ACL TOP 700; Beckman Coulter), factor (F) VIII and FXIII by chromogenic assays and FII, FV, FVII, FIX, FX, FXI and FXII by clotting assays (BCS<sup>®</sup> XP system; Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany).

The human urokinase-plasminogen activator (uPA) and E-selectin kits used were from R&D Systems Europe Ltd. (Abingdon, UK); tissue plasminogen activator (tPA) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) kits were obtained from eBioscience (Hatfield, UK); and thrombin activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) activity kit was from American Diagnostica (Pfungstadt, Germany). All these substances were determined in PPP samples, following the manufacturer's instructions and measured in Multiskan FC with incubator (ThermoScientific, Madrid, Spain).

#### Statistics

The statistical analysis of the experimental data was performed by the Biostatistics Unit of La Paz University Hospital using *ssw* 9.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The Shapiro-Wilk test was used to test normal distribution. For

comparison of multiple groups, a non-parametric one-way ANOVA using Dunn's multiple comparison *post-hoc* test was performed. Comparison of the media of two groups was performed using the Mann-Whitney *U* test. The correlations were calculated with Pearson or Spearman tests, depending on the sample distribution. All tests were two-tailed and level of statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

## Results

### Demographic data of patients with ITP and clinical data

The platelet count of patients with ITP was lower than in healthy controls (ITP patients:  $38 \pm 17 \times 10^9/l$ ; controls:  $211 \pm 60 \times 10^9/l$ ,  $P < 0.001$ ). No differences were found in platelet count, age or clotting factors between the patients with ITP, stratified by gender (Table I).

At sampling, 24 patients were without treatment and 18 were medicated (Table II). Two patients had bleeding manifestations (WHO score = 1), and had platelet counts of  $25 \times 10^9/l$  (on treatment with 2  $\mu$ g/kg romiplostim plus dexamethasone) and  $47 \times 10^9/l$  (treated with 20 mg prednisone).

### Microparticles in plasma from patients with ITP

Microparticle-associated procoagulant capacity was shown to be significantly higher ( $P < 0.01$ ) and in above normal ranges ( $>10$  nmol/l) in the patients with ITP than in the controls (Fig 1A).

To determine the cellular source of MPs, flow cytometry analyses were performed and a significant increase was

Table I. Demographic distribution of patients with ITP and their plasma clotting factors.

	Gender	
	Women	Men
ITP patients, <i>n</i> (%)	27 (64.3%)	15 (35.7%)
Platelet count, $\times 10^9/l$	$32 \pm 15$	$40 \pm 25$
Age, years median (range)	59 (22–86)	59 (28–84)
FG Clauss, mg/dl	$321 \pm 67$	$312 \pm 80$
FII, %	$126 \pm 17$	$105 \pm 4$
FV, %	$137 \pm 19$	$115 \pm 8$
FVII, %	$123 \pm 17$	$144 \pm 33$
FVIII, %	$178 \pm 27$	$161 \pm 54$
FIX, %	$122 \pm 15$	$102 \pm 28$
FX, %	$126 \pm 20$	$98 \pm 13$
FXI, %	$124 \pm 25$	$98 \pm 12$
FXII, %	$105 \pm 24$	$96 \pm 16$
FXIII, %	$114 \pm 25$	$118 \pm 13$

All values are given as mean  $\pm$  standard deviation unless otherwise indicated.

FG, fibrinogen; ITP, immune thrombocytopenia.

Table II. Pharmacological treatment and bleeding score of ITP patients.

Treatment	Female	Male
Without treatment	18	6
Romiplostim		
2 µg/kg	3*	1
3 µg/kg		1
4 µg/kg		1
10 µg/kg + IVIG 1 g/kg × 2 days		1
Eltrombopag		
25 mg/day	1	1
50 mg/day	2	2†
75 mg/day		1‡
Prednisone		
10 mg/day	1	
50 mg/day	1	
Dexamethasone		
1 g/kg × 2 days	1	
IVIG		
1 g/kg × 2 days		1
WHO Bleeding Score		
0	25	15
1	2	

IVIG, intravenous immunoglobulin; WHO, World Health Organization.

\*One patient plus dexamethasone.

†Two patients plus prednisone 20 mg.

‡One patient plus prednisone 50 mg.

observed in the percentage of platelet- and red cell-derived MPs in the samples from the patients with ITP (Fig 1B).

In the patients with ITP, MP-associated thrombogenic ability inversely correlated with platelet count (Spearman  $r = -0.692$ ,  $P < 0.01$ ) but not with red cell number. Moreover, the patients with ITP who had the lowest platelet counts showed the most pronounced increase in platelet-derived MPs (Spearman  $r = -0.591$ ,  $P < 0.01$ ).

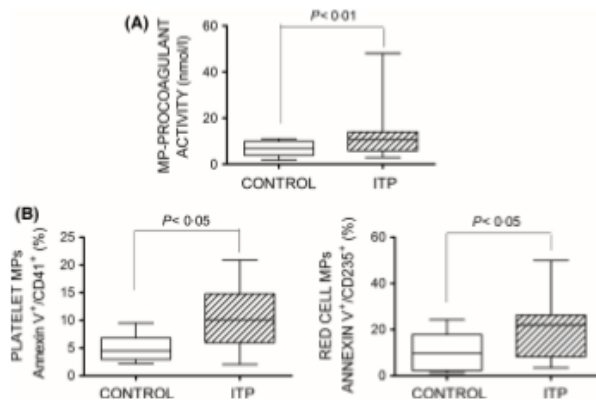


Fig 1. Cellular microparticles in patients with ITP. (A) MP-associated procoagulant activity was determined with the ZYMUPHEN MP-Activity kit. (B) Flow cytometry analysis of MP cellular origin. MPs were labelled with Annexin V-ITC and a PE-labelled antibody specific for a cellular type. Results are expressed as percentage of total annexin V-labelled microparticles. The Mann-Whitney  $U$  test was performed and  $P < 0.05$  was considered significant. ITP, immune thrombocytopenia; MP, microparticle.

### Thromboelastometry studies

ROTEM studies performed with fresh PRP samples showed some significant differences in the dynamics of clot formation when comparing control and ITP samples.

There was a delay in clot formation in the ITP group, as observed by a prolonged CT (control:  $550 \pm 95$  s; ITP:  $890 \pm 165$  s,  $P < 0.01$ ), a diminished alpha angle (control:  $62.8 \pm 4.3$ ; ITP:  $53.5 \pm 7.5$ ,  $P < 0.05$ ) and clot firmness assessed as amplitude at 5 min (A5, control:  $28.8 \pm 3.3$ ; ITP:  $26.5 \pm 7.5$ ,  $P < 0.05$ ). Nevertheless, clot amplitude at 10 min was similar in both groups, and afterwards, an increased MCF (control:  $46.7 \pm 3.1$  mm; ITP:  $52.4 \pm 6.1$  mm,  $P < 0.05$ ) and reduced LI60 (control:  $90.6 \pm 3.0\%$ ; ITP:  $95.5 \pm 3.4\%$ ,  $P < 0.05$ ) were observed in the ITP samples (Fig 2).

These results showed two singular features in the haemostasis of the patients with ITP: a deferral of clot formation and a higher resistance to fibrinolysis. Under our experimental conditions, this clotting test provided integral information on platelet and plasma procoagulant/anticoagulant protein interactions; thus, we attempted to elucidate the responsibility of each of these elements in this anomalous thromboelastogram profile.

### Functional state of platelets from patients with ITP

Platelets from ITP patients had a defect in their ability to be activated, as shown by the lower PAC1 binding and surface exposure of P-selectin after stimulation with TRAP (Fig 3A, B, respectively).

### ITP plasma coagulant capacity

Figure 4A shows the CAT parameters obtained with PPP samples from the control subjects and the patients with ITP. Increased ETP (control:  $1223.8 \pm 257.7$  nmol/l min; ITP:



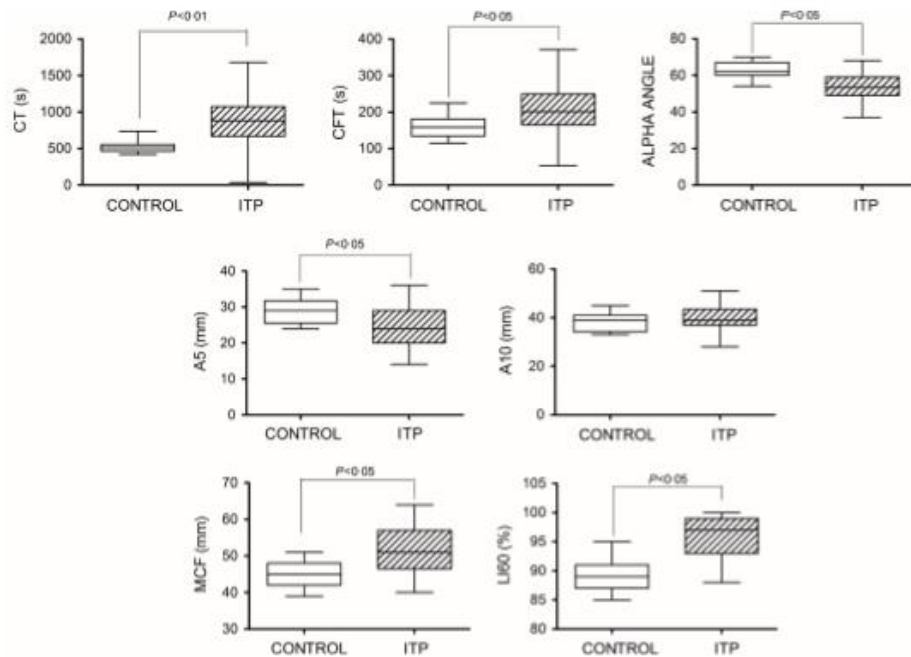


Fig 2. Features of clot formation in patients with ITP. Thromboelastography was performed in platelet rich plasma adjusted to  $25 \times 10^9$  platelets/L. Detailed procedures and measured parameters are explained in *Materials and methods*. The Mann-Whitney *U* test was performed and  $P < 0.05$  was considered significant. ITP, immune thrombocytopenia; CT, clotting time; CFT, clot formation time; A5, amplitude at 5 min; A10, amplitude at 10 min; MCF, maximum clot firmness; LI60, lysis at 60 min.

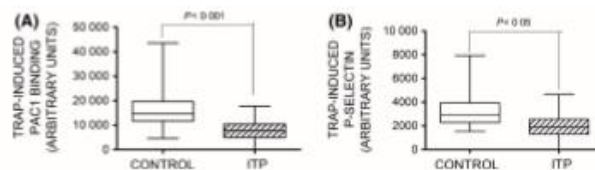


Fig 3. Platelet activation markers after agonist platelet stimulation. Platelets from healthy controls and from patients with immune thrombocytopenia (ITP) were stimulated with thrombin receptor-activating peptide (TRAP), then binding of FITC-PAC1 (A) and of FITC-anti-P-selectin mAb (B) were analysed by flow cytometry. The data were expressed as arbitrary units (mean fluorescence X% of positive cells). The Mann-Whitney *U* test was performed and  $P < 0.05$  was considered significant.

$1696.4 \pm 524$  nmol/l  $\times$  min,  $P < 0.05$ ) and peak (control:  $225.7 \pm 82.8$  nmol/l; ITP:  $310.4 \pm 106.1$  nmol/l,  $P < 0.05$ ) were observed in the ITP patients, indicating that plasma from the patients with ITP had a procoagulant profile.

Plasma from ITP patients possessed normal levels of fibrinogen and clotting factors (Table I), so this might not be the cause of the increased procoagulant profile.

We tested whether the higher procoagulant activity of plasma from ITP patients was due to a resistance to protein C, by performing CAT experiments with and without TM. We observed that the mean ratio value in the patients with ITP was slightly higher than the mean ratio of the controls ( $60 \pm 18$  and  $50 \pm 13$ , respectively,  $P = 0.034$ , Fig 4B) indicating some resistance to the protein C system in the ITP group.

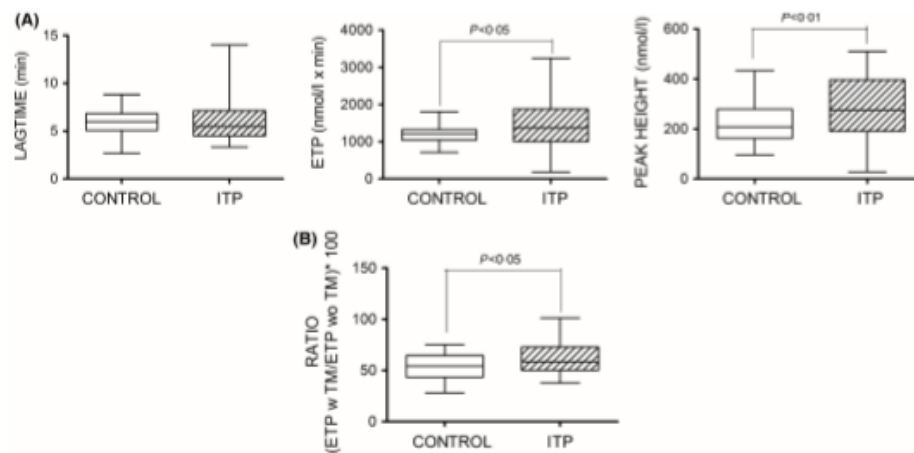


Fig 4. Procoagulant capacity in plasma from patients with ITP. (A) Plasma procoagulant activity was measured by calibrated automated thrombogram (CAT) in platelet poor plasma (PPP) samples triggered by 1 pmol/l of recombinant human tissue factor and 4  $\mu$ mol/l of phospholipid mixture. (B) Experiments were performed with and without thrombomodulin and results were expressed as the ratio between them. Detailed procedures and measured parameters are explained in *Materials and methods*. The Mann-Whitney *U* test was performed and  $P < 0.05$  was considered significant. ETP, endogenous thrombin potential; ITP, immune thrombocytopenia.

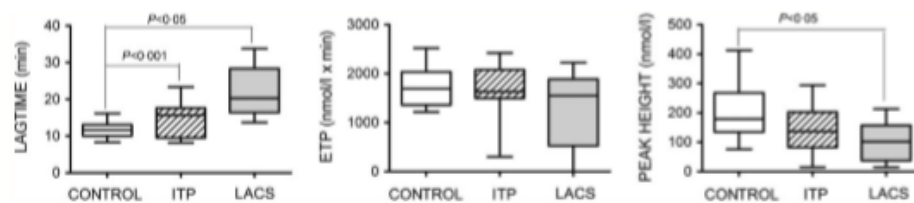


Fig 5. Effect of plasma from patients with ITP on procoagulant capacity of control platelets. Washed control platelets were resuspended and adjusted to  $25 \times 10^9$  platelets/l with platelet poor plasma (PPP) from controls, patients with ITP or patients with LACS. Coagulation was triggered by stimulation with 100  $\mu$ mol/l thrombin receptor-activating peptide (TRAP). Non-parametric one-way ANOVA and Dunn's multiple comparison test were performed and  $P < 0.05$  was considered significant. ETP, endogenous thrombin potential; ITP, immune thrombocytopenia; LACS, lupus anticoagulant antibodies.

#### ITP plasma on the procoagulant capacity of control platelets

Thrombin generation assay (TGA) in PRP samples reflects the combined effect of the clotting factors of PPP plus the procoagulant function of platelets. According to the CAT results presented above, PPP from patients with ITP does not seem to account for the delay in clot formation. Taking into account that ITP is an acquired immune-mediated disorder caused by autoantibodies against platelet proteins, we hypothesized that the delay in clot formation observed in ROTEM<sup>®</sup> test might be the consequence of a lupus-anticoagulant-like effect related to the presence antibodies against platelets in ITP plasma. So, the effect of ITP and control plasma on the procoagulant capacity of platelets from the healthy controls

was tested. For comparison, the effect of plasma positive for LACS on control platelets was also assayed. PPP from the patients with ITP caused an extension in lagtime for thrombin generation compared with that of the control platelets (control:  $10.5 \pm 0.5$  s; ITP:  $15.5 \pm 1.2$  s,  $P < 0.05$ ) (Fig 5), and had no effect on other CAT parameters. PPP with LACS also increased lagtime (LACS:  $22.3 \pm 6.7$  s,  $P < 0.001$ ) and diminished peak height (control:  $220 \pm 88$  nmol/l; LACS:  $100 \pm 67$  nmol/l,  $P < 0.01$ ).

#### Fibrinolysis in patients with ITP

To evaluate whether increased LI60 values in ITP patients were due to an imbalance in fibrinolysis-related proteins,

Table III. Fibrinolysis-related proteins.

	Control median (range)	ITP median (range)
TAI <sub>3</sub> , % of activity	32.4 (28.79–37.0)	30.8 (28.0–35.2)
uPA, pg/ml	612.8 (539.9–749.9)	720.5 (634.9–808.8)
tPA, pg/ml	753.0 (578.6–959.0)	750.4 (565.9–912.2)
PAI-1, ng/ml	10.4 (6.6–23.4)	27.01 (16.2–43.8)*
E-Selectin, ng/ml	10.69 (6.57–14.47)	30.49 (17.53–45.33)*

The Mann–Whitney *U* test was performed and  $P < 0.05$  was considered significant. Asterisks denote significant differences between groups.

ITP, immune thrombocytopenia; PAI-1, inhibitor-1; TAI<sub>3</sub>, thrombin activatable fibrinolysis inhibitor; tPA, tissue plasminogen activator; uPA, urokinase plasminogen activator.

tPA, uPA and PAI-1 antigenic plasma levels and TAI<sub>3</sub> plasma activity were measured. No differences were observed between the patients and the healthy controls except for PAI-1, the level of which was increased in ITP patients (Table III). Because plasma PAI-1 might be increased as a consequence of endothelial damage, plasma concentration of E-selectin, a marker of endothelial injury, was determined. E-selectin was increased in samples from the ITP patients (Table III). MCF correlated with E-selectin (Spearman  $r = 0.6643$ ,  $P < 0.001$ ) and fibrinogen concentrations (Spearman  $r = 0.8877$ ,  $P < 0.0001$ ), whereas LI60 correlated with E-selectin (Spearman  $r = 0.6053$ ,  $P < 0.001$ ).

## Discussion

The concept that chronic ITP could have pro-thrombotic characteristics has progressively gained acceptance during the past decade, as various clinical studies have shown an increased risk of thromboembolic events among these patients (Sarpatawari *et al.*, 2010; Severinsen *et al.*, 2011; Norgaard *et al.*, 2016). Nevertheless, no adequate explanation has been provided for this phenomenon.

Although thrombotic complications are reported in up to 6% of patients (Rodeghiero *et al.*, 2013) these events frequently coincide with platelet recovery ( $>50 \times 10^9/l$ ) and rarely occur in the setting of persistent and severe thrombocytopenia.

Our results show that patients with ITP, regardless of their platelet count and treatment, presented a procoagulant profile due to an increased amount of platelet- and red cell-MPs, a slight but significantly increased resistance to protein C and the formation of a clot more resistant to fibrinolysis due to augmented levels of PAI-1. These procoagulant characteristics of ITP patients are not an epiphenomenon caused by low platelet count because samples from patients with myelodysplastic syndromes and thrombocytopenia showed a MCF and PAI-1 and E-selectin plasma levels similar to those of the healthy control group (data not shown).

Thus, prior to commencing therapeutic treatments, careful clinical evaluation, including an assessment for prothrombotic states, should be considered because they can modify

the prothrombotic profile of patients with ITP (Marie *et al.*, 2006; Huerta *et al.*, 2007; Kuter *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2011).

Microparticles are small membrane vesicles that are released from many cell types by exocytic budding of the plasma membrane in response to cellular activation or apoptosis. In this work, and in accordance with previous studies (Zucker-Franklin & Karpatkin, 1977; Jy *et al.*, 1992; Sewify *et al.*, 2013), we found an increased level of platelet- and red cell-derived MPs in ITP patients compared with controls.

Platelet-derived MPs inversely correlated to platelet count. Given that platelets from the patients with ITP displayed a decreased expression of platelet activation markers than the healthy controls following similar agonist stimulation, MP generation might be due to increased platelet apoptosis. In further support of this hypothesis, enhanced apoptosis in platelets from the patients with ITP has been reported (Qiao *et al.*, 2016).

Other groups also reported the presence of circulating platelet-derived MPs in patients with ITP and demonstrated that ITP patients with higher CD42b<sup>+</sup> MP counts had a significantly lower risk of bleeding (Connor *et al.*, 2013) but a higher risk of thromboembolic events (Jy *et al.*, 2013). Moreover, circulating platelet-derived MPs with procoagulant activity have been proposed as a potential cause of thrombosis in many diseases (Ando *et al.*, 2002; Goubran *et al.*, 2015).

Regarding the procoagulant properties of red cell-derived MPs, they have been reported to have a broad haemostatic activity because they enhance both primary (platelet) and secondary (coagulation) haemostasis (Jy *et al.*, 2013). This effect on coagulation was due to the exposition of phosphatidylserine and the initiation of thrombin generation independent of TF in a FXII-dependent manner (van der Meijden *et al.*, 2012a).

In this study, thromboelastography with the ROTEM<sup>®</sup> system was a valuable tool for studying haemostasis in patients with ITP. ROTEM<sup>®</sup> technology provides real-time analysis of the viscoelastic properties of clot formation and dissolution. The NATEM test that was employed here is sensitive to any change in the balance of coagulation system but has low specificity (Trelinski *et al.*, 2014).

Analyses of the ROTEM<sup>®</sup> parameters in our cohort of ITP patients showed a prolonged CT, an increased MCF and resistance to clot lysis, highlighting a hypercoagulable profile in these patients when compared with healthy controls. As these experiments were performed in PRP samples adjusted to the same platelet count, differences observed in ROTEM<sup>®</sup> profile of ITP patients were not due to differences in platelet count between both groups. Gunduz *et al.* (2011) employed ROTEM<sup>®</sup> in an attempt to predict bleeding in patients with ITP and observed that MCF was lower in the patients with haemorrhagic symptoms. This result could be explained by the fact that the platelet count in the ITP bleeding group is at least five times lower than in the ITP non-bleeding group.

It has been reported that MCF for patients with ITP and a platelet count below than  $100 \times 10^9/l$  was within normal laboratory reference ranges (Kim *et al.*, 2015). This

observation suggests the presence of other factors in ITP samples that overcame the effect of low platelet count.

The hypofibrinolysis observed in our study could be due, at least in part, to the increased levels of PAI-1. Increased plasma levels of PAI-1 are considered a marker of endothelial damage (Ostrowski *et al*, 2015). Our observation that plasma PAI-1 and E-selectin levels were augmented in our ITP cohort might suggest endothelial damage in these patients. Endothelial damage in ITP has previously been reported (Fruchter *et al*, 2002) as a consequence of the presence of autoantibodies directed against antigens present on both platelets and endothelial cells or against platelets similar to others present in endothelial cells (Thiagarajan *et al*, 1985; Giltay *et al*, 1989; Majka *et al*, 2007).

Increased circulating MPs, a condition present in patients with ITP, could also support formation of more compact fibrin clots that are less susceptible to fibrinolysis because of their massive incorporation into arterial or venous clots and thrombi (Zubairova *et al*, 2015).

The CT prolongation observed in patients with ITP might be due to platelet function impairment, any plasma component or both of these. Platelet participation in this effect is supported by the fact that platelets from ITP patients had an impaired ability to be stimulated by agonists (Psaila *et al*, 2012; Álvarez Roman *et al*, 2014). To test the possibility that a plasma component was also involved in CT extension, the procoagulant feature of plasma was tested by evaluating thrombin generation using synthetic phospholipids or platelets from healthy controls as phospholipids source.

An enhanced procoagulant profile was observed when plasma from the patients with ITP was triggered with TP and synthetic phospholipids. This effect was due, at least in part, to a resistance to protein C, as suggested by experiments in the presence of TM. On the other hand, our results show a significant prolongation of the lagtime when platelets from the healthy controls stimulated with TRAP were incubated with plasma from the patients with ITP. Because the platelets employed were functional (experiments were performed with a pool of platelets from healthy subjects), and clotting factors and fibrinogen in plasma from the patients with ITP were within normal ranges, the involvement of these elements in the increase in lagtime can be ruled out.

These results were similar to those observed in plasma with LACs. LACs can be detected by their anticoagulant properties in TGA by an increased lagtime. LACs and anti-cardiolipin antibodies are antiphospholipid antibodies that can be found in approximately 40% of adult patients with ITP (Stasi *et al*, 1994; Pierrot-Deseilligny Despujol *et al*, 2008). In our ITP cohort, there were two patients positive

for LACs who were removed from the analyses of the effect of PPP on the procoagulant capacity of platelets. The delay in clot formation might rely on the presence of anti-platelet antibodies in plasma from patients with ITP. In support of this hypothesis, the TGT parameters obtained in PRP samples were diminished by antibodies blocking glycoprotein (GP)IIb-IIIa or GPIb (Reverter *et al*, 1996) by antiplatelet drugs (Herault *et al*, 1999; van der Meijden *et al*, 2012b) and in the presence of LACs (Devreese *et al*, 2009; present results).

Our study supports the existence of a procoagulant profile that seems to be caused by several pathological mechanisms in an ITP cohort that had not undergone thrombotic events.

Taking into account this information and following the recommendations of Rodeghiero (2016) the treatment of patients with ITP should be individualized, taking into consideration their procoagulant profile and the presence of concomitant risk factors that can be further modified (e.g. smoking, oral contraceptive use and lifestyle considerations) and limited to those patients at risk of bleeding. This study has identified that thromboelastography is a useful tool to evaluate this pathological condition in patients with ITP. Given that this technique assesses global information on cellular and soluble procoagulant/anticoagulant protein interactions, it should be the method of choice to guide therapeutic treatment when available.

## Acknowledgements

This work was supported by a grant from the FIS-FEDER, PI12/01831 and PI15/01457 (NVB). NVB holds a Miguel Servet II tenure track grant from FIS-FEDER. The authors would like to thank the skilful collaboration of nursing staff and assistants from the Blood Donor Section of the Haematology Unit of Hospital Universitario La Paz.

## Authorship contribution

IFB, EGAS and RJ performed the experiments. MTAR, MMS, MIRP and VJY diagnosed and provided clinical care to ITP patients. MTAR, MMS and MIRP collected and verified patient information. MTAR, IFB, VJ-Y and NVB analysed the results. IFB and NVB designed the experiments. NVB was the principal investigator and wrote the paper.

## Conflicts of interest

No competing interests to declare.

## References

Álvarez Roman, M.T., Fernández Belis, I., Arias-Salgado, E.G., Rivas Pollmar, M.L., Jiménez Yuste, V., Martín Salces, M. & Butta, N.V.

(2014) Effects of thrombopoietin receptor agonists on procoagulant state in patients with immune thrombocytopenia. *Thrombosis and Haemostasis*, 112, 65–72.

Ando, M., Iwata, A., Ozeki, Y., Tsuchiya, K., Akiba, T. & Nihei, H. (2002) Circulating platelet-derived microparticles with procoagulant activity may be a potential cause of thrombosis



- in uremic patients. *Kidney International*, 62, 1757–1763.
- Arnout, J. (2001) Antiphospholipid syndrome: diagnostic aspects of lupus anticoagulants. *Thrombosis and Haemostasis*, 86, 83–91.
- Cheng, G., Saleh, M.N., Marcher, C., Vasey, S., Mayer, B., Aivado, M., Arning, M., Stone, N.J. & Bussel, J.B. (2011) Efficacy of rituximab for management of chronic immune thrombocytopenia (RAIST): a 6-month, randomised, phase 3 study. *Lancet*, 377, 393–402.
- Cines, D.B., Bussel, J.B., Liebman, H.A. & Luning Prak, E.T. (2009) The TTP syndrome: pathogenic and clinical diversity. *Blood*, 113, 6511–6521.
- Connor, D.E., Ma, D.D. & Joseph, J.I. (2013) Flow cytometry demonstrates differences in platelet reactivity and microparticle formation in subjects with thrombocytopenia or thrombocytosis due to primary haematological disorders. *Thrombosis Research*, 132, 572–577.
- Devereux, K., Peerlück, K., Arnout, J. & Hoylaerts, M.F. (2009) Laboratory detection of the antiphospholipid syndrome via calibrated automated thrombography. *Thrombosis and Haemostasis*, 101, 185–196.
- Doubarou, I.U., Nandigam, R., Bennett, D., Newland, A. & Provan, D. (2016) Thromboembolism in adults with primary immune thrombocytopenia: a systematic literature review and meta-analysis. *European Journal of Haematology*, 97, 321–330.
- Fogarty, P.J., Tarantino, M.D., Brinsky, A., Sigonovich, J. & Grotzinger, K.M. (2012) Selective validation of the WHO Bleeding Scale in patients with chronic immune thrombocytopenia. *Current Medical Research and Opinion*, 28, 79–87.
- Fruchter, O., Blich, M. & Jacob, G. (2002) Fatal acute myocardial infarction during severe thrombocytopenia in a patient with idiopathic thrombocytopenic purpura. *American Journal of the Medical Sciences*, 323, 279–280.
- Gillat, J.C., Brinkman, H.J., Modderman, P.W., von dem Borne, A.E. & van Mourik, J.A. (1989) Human vascular endothelial cells express a membrane protein complex immunohistochemically indistinguishable from the platelet VLA-2 (glycoprotein Ia-IIa) complex. *Blood*, 73, 1235–1241.
- Goubreau, H., Sahy, W., Koth, R., Seghatchian, J. & Burnouf, T. (2015) Platelet microparticles and cancer: an intimate cross-talk. *Transfus Apher Sci*, 53, 168–172.
- Gunduz, B., Akay, O.M., Bal, C. & Gulbas, Z. (2011) Can thrombelastography be a new tool to assess bleeding risk in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura? *Platelets*, 22, 516–520.
- Hemker, H.C., Giesen, P., Al Dieri, R., Regnault, V., de Smedt, E., Wagenvoort, R., Lecomte, T. & Beguin, S. (2003) Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 33, 4–15.
- Herauld, J.P., Dol, F., Gaich, C., Bernat, A. & Herbert, J.M. (1999) Effect of clopidogrel on thrombin generation in platelet-rich plasma in the rat. *Thrombosis and Haemostasis*, 81, 957–960.
- Huerta, C., Johansson, S., Wallander, M.A. & Garcia Rodriguez, I.A. (2007) Risk factors and short-term mortality of venous thromboembolism diagnosed in the primary care setting in the United Kingdom. *Archives of Internal Medicine*, 167, 935–943.
- Jy, W., Horstman, L.L., Arce, M. & Ahn, Y.S. (1992) Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 119, 334–345.
- Jy, W., Johansen, M.E., Bidot, Jr, C., Horstman, L.L. & Ahn, Y.S. (2013) Red cell-derived microparticles (RMP) as haemostatic agent. *Thrombosis and Haemostasis*, 110, 751–760.
- Kim, W.H., Park, J.B., Jung, C.W. & Kim, G.S. (2015) Rebalanced hemostasis in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Platelets*, 26, 38–42.
- Kuter, D.J., Rummel, M., Boccia, R., Macik, B.G., Pabinger, I., Selleslag, D., Rodeghiero, F., Chong, B.H., Wang, X. & Berger, D.P. (2010) Romiplostim or standard of care in patients with immune thrombocytopenia. *New England Journal of Medicine*, 363, 1889–1899.
- Lakshmanan, S. & Cuker, A. (2012) Contemporary management of primary immune thrombocytopenia in adults. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10, 1988–1998.
- Magda, M., Kijowski, J., Lesko, R., Gózdlik, J., Zupanska, B. & Ratajczak, M.Z. (2007) Evidence that platelet-derived microvesicles may transfer platelet-specific immunoreactive antigens to the surface of endothelial cells and CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem/progenitor cells – implication for the pathogenesis of immune thrombocytopenias. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 45, 27–32.
- Marie, I., Maurey, G., Herve, F., Hellot, M.F. & Levesque, H. (2006) Intravenous immunoglobulin-associated arterial and venous thrombosis: report of a series and review of the literature. *British Journal of Dermatology*, 155, 714–721.
- van der Meijden, P.E., Van Schilligard, M., Van Oerle, R., Renne, T., ten Cate, H. & Spronk, H.M. (2012a) Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10, 1355–1362.
- van der Meijden, P.E., Feijge, M.A., Swieringa, F., Gilio, K., Norgiz-Unal, R., Hamulyak, K. & Hermans, J.W. (2012b) Key role of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (3) signaling to Syk kinase in tissue factor-induced thrombin generation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 3481–3492.
- Norgaard, M. (2012) Thrombosis in patients with primary chronic immune thrombocytopenia. *Thrombosis Research*, 130, 574–575.
- Norgaard, M., Cetin, K., Mæghbak, M.L., Kristensen, N.R., Ghanima, W., Bahmanyar, S., Stryker, S. & Christiansen, C.F. (2016) Risk of arterial thrombotic and venous thromboembolic events in patients with primary chronic immune thrombocytopenia: a Scandinavian population-based cohort study. *British Journal of Haematology*, 174, 639–642.
- Ostrowski, S.R., Haase, N., Muller, R.B., Moller, M.H., Pott, F.C., Perner, A. & Johansson, P.J. (2015) Association between biomarkers of endothelial injury and hypocoagulability in patients with severe sepsis: a prospective study. *Critical Care*, 19, 191.
- Pierrot-Descilligny Despojol, C., Michel, M., Khellaf, M., Gossault, M., Intrator, L., Bierling, P. & Godeau, B. (2008) Antiphospholipid antibodies in adults with immune thrombocytopenic purpura. *British Journal of Haematology*, 142, 638–643.
- Provan, D., Stasi, R., Newland, A.C., Blanchette, V.S., Bolton-Maggs, P., Bussel, J.B., Chong, B.H., Cines, D.B., Gernsheimer, T.B., Godeau, B., Grainger, I., Greer, I., Hunt, B.J., Imbach, P.A., Lyons, G., McMillan, R., Rodeghiero, F., Sanz, M.A., Tarantino, M., Watson, S., Young, J. & Kuter, D.J. (2010) International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood*, 115, 168–186.
- Psaila, B., Bussel, J.B., Linden, M.D., Babula, B., Li, Y., Barnard, M.R., Tate, C., Mathur, K., Freilinger, A.J. & Michelson, A.D. (2012) In vivo effects of eltrombopag on platelet function in immune thrombocytopenia: no evidence of platelet activation. *Blood*, 119, 4066–4072.
- Qian, J., Liu, Y., Li, D., Wu, Y., Li, X., Yao, Y., Niu, M., Fu, C., Li, H., Ma, P., Li, Z., Xu, K. & Zeng, L. (2016) Imbalanced expression of B2-2L and Bax in platelets treated with plasma from immune thrombocytopenia. *Immunologic Research*, 64, 604–609.
- Reverer, J.C., Beguin, S., Kessels, H., Kumar, R., Hemker, H.C. & Coller, B.S. (1996) Inhibition of platelet-mediated, tissue factor-induced thrombin generation by the mouse/human chimeric 7E3 antibody. Potential implications for the effect of c7E3 Fab treatment on acute thrombosis and “clinical restenosis”. *Journal of Clinical Investigation*, 98, 863–874.
- Rodeghiero, F. (2016) Is TTP a thrombotic disorder? *American Journal of Hematology*, 91, 39–45.
- Rodeghiero, F., Stasi, R., Gernsheimer, T., Michel, M., Provan, D., Arnold, D.M., Bussel, J.B., Cines, D.B., Chong, B.H., Cooper, N., Godeau, B., Lechner, K., Mazzacconi, M.G., McMillan, R., Sanz, M.A., Imbach, P., Blanchette, V., Kuhne, T., Ruggeri, M. & George, J.N. (2009) Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood*, 113, 2386–2393.
- Rodeghiero, F., Michel, M., Gernsheimer, T., Ruggeri, M., Blanchette, V., Bussel, J.B., Cines, D.B., Cooper, N., Godeau, B., Greinacher, A., Imbach, P., Khellaf, M., Klassen, R.J., Kuhne, T., Liebman, H., Mazzacconi, M.G., Newland, A.,

- Pabinger, I., Tosetto, A. & Stasi, R. (2013) Standardization of bleeding assessment in immune thrombocytopenia: report from the International Working Group. *Blood*, 121, 2596–2606.
- Sarpatawari, A., Bennett, D., Logie, J.W., Shukla, A., Beach, K.J., Newland, A.C., Sanderson, S. & Provan, D. (2010) Thromboembolic events among adult patients with primary immune thrombocytopenia in the United Kingdom General Practice Research Database. *Haematologica*, 95, 1167–1175.
- Severinsen, M.T., Engelhjerg, M.C., Farkas, D.K., Jensen, A.O., Norgaard, M., Zhao, S. & Sørensen, H.T. (2011) Risk of venous thromboembolism in patients with primary chronic immune thrombocytopenia: a Danish population-based cohort study. *British Journal of Haematology*, 152, 360–362.
- Sewily, E.M., Sayed, D., Abdel Aal, R.F., Ahmad, H.M. & Abdou, M.A. (2013) Increased circulating red cell microparticles (RMP) and platelet microparticles (PMP) in immune thrombocytopenic purpura. *Thrombosis Research*, 131, e59–e63.
- Stasi, R., Stipa, E., Masi, M., Oliva, F., Sciarra, A., Perrotti, A., Olivieri, M., Zaccari, G., Gandolfo, G.M., Galli, M., Barbui, T. & Papa, G. (1994) Prevalence and clinical significance of elevated antiphospholipid antibodies in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 84, 4203–4208.
- Thiagarajan, P., Shapiro, S.S., Levine, E., DeMarco, I. & Yalcin, A. (1985) A monoclonal antibody to human platelet glycoprotein IIIa detects a related protein in cultured human endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 75, 896–901.
- Trelinski, J., Misiewicz, M., Robak, M., Smolewski, P. & Chojnowski, K. (2014) Assessment of rotation thromboelastometry (ROTEM) parameters in patients with multiple myeloma at diagnosis. *Thrombosis Research*, 133, 667–670.
- Zubairova, I.D., Nabiullina, R.M., Nagaswami, C., Zuev, Y.F., Mustafin, I.G., Litvinov, R.I. & Weisel, J.W. (2015) Circulating microparticles alter formation, structure, and properties of fibrin clots. *Scientific Reports*, 5, 17611.
- Zucker-Franklin, D. & Karpatskin, S. (1977) Red-cell and platelet fragmentation in idiopathic autoimmune thrombocytopenic purpura. *New England Journal of Medicine*, 297, 517–523.

## Effects of thrombopoietin receptor agonists on procoagulant state in patients with immune thrombocytopenia

María Teresa Álvarez Román<sup>1</sup>; Iñosevany Fernández Bello<sup>1</sup>; Elena G. Arias-Salgado<sup>1</sup>; María Isabel Rivas Pollmar<sup>2</sup>; Víctor Jiménez Yuste<sup>1,3</sup>; Mónica Martín Salces<sup>1</sup>; Nora V. Butta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hematology Unit, Hospital Universitario La Paz-IDIPAZ, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Hematology Unit, Hospital Universitario La Princesa, Madrid, Spain; <sup>3</sup>Universidad Autónoma de Madrid, Spain

### Summary

Thrombopoietin receptor agonists (TPO-RA) have recently been introduced for the treatment of immune thrombocytopenia (ITP), an anti-platelet-antibodies autoimmune disease. The observation of a low frequency of bleeding episodes despite their thrombocytopenia suggests the existence of a compensatory mechanism. This study aimed to evaluate the effect of TPO-RA treatment on platelet function and on the procoagulant state in ITP patients before (ITP-bR) and after responding (ITP-aR) to treatment. Plasma- and microparticle (MP)-associated procoagulant capacity from ITP patients was similar before and after responding to the TPO-RA regimen but higher than the healthy control values. High MP-associated procoagulant activity did

not seem to be due to increased platelet activation, since platelet stimulation by agonists was reduced in ITP-bR and ITP-aR patients. It could be related to increased platelet apoptosis, evaluated in terms of surface phosphatidylserine (PS), observed in both ITP groups. In summary, TPO-RA treatment increased platelet count but did not ameliorate their function and did not change plasma- and MP-associated procoagulant state of ITP patient responders to this therapy.

### Keywords

Thrombopoietin receptor agonists, platelets, thrombin generation, microparticle-associated procoagulant state

### Correspondence to:

Nora V. Butta  
Unidad de Hematología  
Hospital Universitario La Paz  
Paseo de la Castellana 261  
28046, Madrid, Spain  
Tel.: +34 91 7277000 x 42258, fax: +34 3582211  
E-mail: nora.butta@salud.madrid.org

### Financial support:

This work was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación-Fondo Europeo de Desarrollo Regional (Feder) P509/00531 (NVR) and PI12/01831.

Received: October 26, 2013

Accepted after minor revision: January 24, 2014

Epub ahead of print: February 6, 2014

<http://dx.doi.org/10.1160/TH13-10-0873>

Thromb Haemost 2014; 112: 65–72

## Introduction

Immune thrombocytopenia (ITP) is an autoimmune condition characterised by antibody-mediated accelerated platelet destruction and suboptimal platelet production (1, 2).

Bleeding risk in patients with ITP is increased with platelet counts less than 20 or 30 × 10<sup>9</sup>/l, and the majority of clinicians use the platelet threshold of < 30 × 10<sup>9</sup>/l as a trigger for treatment (3). However, patients with ITP often have few bleeding symptoms despite very low platelet counts, suggesting that ITP platelets are highly functional (4, 5). Moreover, an increased risk for thrombosis in patients with ITP has been described (6, 7) which may reach twice that of control subjects (8).

Several factors may contribute to the prothrombotic state in ITP (7). The production of cell-derived microparticles (MP) and increased levels of some coagulation factors have recently been reported as possible causes of increased thrombotic risk in ITP patients (9).

Two new compounds have recently been approved for the treatment of chronic ITP (second-line treatment). These are the thrombopoietin receptor agonists (TPO-RA) romiplostim (Nplate<sup>®</sup>;

Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) and eltrombopag (Promacta<sup>®</sup>, Revolade<sup>®</sup>; GlaxoSmithKline, London, UK). Romiplostim is formulated for weekly subcutaneous injection, whereas eltrombopag is an orally bioavailable small molecule formulated for once daily oral administration. Both molecules bind to the thrombopoietin receptor (TPO-R) and activate the thrombopoietin (TPO) signalling pathways (10), resulting in megakaryopoiesis.

Based on data from TPO-RA clinical trials, an increase in thrombotic risk in patients treated with these therapies cannot be excluded (6).

In the present study we investigated the procoagulant state in ITP patients treated with TPO-RA before (ITP-bR) and after (ITP-aR) having responded to the treatment.

## Materials and methods

### Study design and subjects

This was an observational and prospective study. Patients with chronic ITP, as defined by Rodeghiero et al. (11), in whom treatment with a TPO-RA was indicated and healthy controls were in-

Table 1: Demographic and clinical characteristics of ITP patients.

Patient	Age (years)	Gender	Time since diagnosis (years)	Previous treatments	TPO-RA (E, R) Initial dose	TPO-RA (E, R) Dose at sampling ITP-aR	Time to response (weeks)	Concomitant treatments	Baseline platelet count (x 10 <sup>9</sup> /l)	Platelet count at ITP-aR (x 10 <sup>9</sup> /l)
1	81	F	11	Corticoids, IVig, azathioprine	E 25 mg/d	E 25 mg/48 h	1	Corticoids	43	158
2	43	F	3.3	Corticoids, IVig	E 50 mg/d	E 25 mg/d	1	IVig	64	190
3	38	M	35	Corticoids, IVig, azathioprine, splenectomy	E 50 mg/d	E 50 mg/d	7	IVig	11	120
4	79	F	24	Corticoids, IVig	E 50 mg/d	E 50 mg/d	1	-	14	118
5	72	M	19	Corticoids, IVig	E 50 mg/d	E 25 mg/48 h	9	-	2	97
6	73	F	6.5	Corticoids, IVig rituximab, Romiplostim	E 50 mg/d	E 75 mg/d	2	-	28	133
7	39	F	5.5	Corticoids, IVig	E 50 mg/d	E 75 mg/d	7	-	23	100
8	80	F	3.3	Corticoids, IVig Romiplostim	E 50 mg/d	E 50 mg/d	5	IVig	7	187
9	52	F	15.5	Corticoids, IVig	E 50 mg/d	Nothing	4	IVig	16	105
10	70	M	8.8	Corticoids, IVig, dapsone, splenectomy	E 50 mg/d	E 25 mg/d	4	-	29	132
11	77	M	4.5	Corticoids, IVig	E 50 mg/d	E 25 mg/72 h	3	IVig	14	159
12	81	M	2.5	Corticoids, IVig, Eltrombopag	R 3 µg/kg/week	R 3 µg/kg/week	9	IVig	15	205
13	42	M	3.5	Corticoids, IVig, rituximab	E 50 mg/d	E 25 mg/d	1	-	27	123

E: eltrombopag; R: romiplostim; IVig: intravenous immunoglobulin. Time to response: time until platelet counts were maintained  $\geq 30 \times 10^9/l$  without additional treatment. ITP-aR: ITP patients after responding to TPO-RA. h: hours. d: day.

cluded. Since it was difficult to obtain samples from healthy older aged controls, mean age of the control group was lower than the mean age of patients with ITP. In order to verify that mean age difference did not bias our results, statistical analyses of data obtained in controls younger or older than 65 years of age were performed and no differences were observed between groups.

ITP patients were studied at two times: at inclusion (ITP-br), when platelet count was less than  $30 \times 10^9/l$  for patients without concomitant medication or less than  $65 \times 10^9/l$  for patients receiving corticosteroids or intravenous immunoglobulin (IVig); and after a response to TPO-RA therapy was elicited (ITP-aR). The response to TPO-RA was defined as a platelet count between 30 and  $100 \times 10^9/l$  and at least twice the baseline count.

The La Paz University Hospital Ethics Committee approved the experimental protocol. The research was carried out in compliance with the Helsinki Declaration and after receiving participants' informed consent in writing.

Study data were analyzed by MTA, IFB, EGAS, VJY and NVB; all authors had full access to primary data.

#### Cell counts and preparation of platelet-rich plasma (PRP) and washed platelets

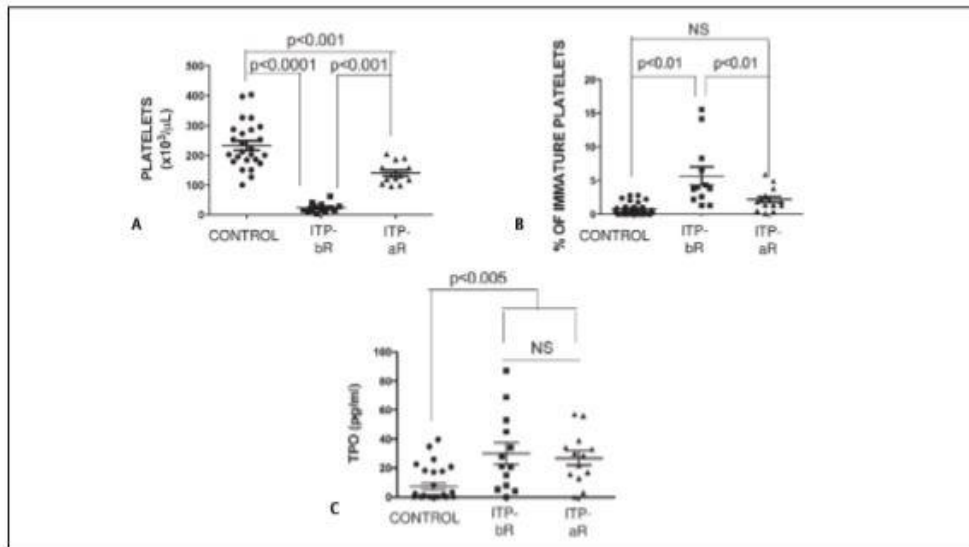
Human peripheral blood samples were collected in 3.8% sodium citrate. Platelet counts were determined with a Coulter Ac. T Diff cell counter (Beckman Coulter, Madrid, Spain).

Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation of whole blood (150 g for 20 minutes [min] at 23°C). To obtain washed platelets, PRP was collected and centrifuged (650 g for 10 min at 23°C) after the addition of acid-citrate-dextrose (1:10). The pellet was resuspended in HEPES buffer (10 mM HEPES, 145 mM NaCl, 5 mM KCl and 1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.4).

#### Assay of reticulated platelets

Reticulated platelets (RP) were measured as previously described (12). Briefly, fixed platelets were labelled with 5 µl of phycoerythrin (PE)- monoclonal antibody (mAb) against the  $\alpha IIb$  subunit (Biocytex, Marseille, France) and then with Retic-COUNT (thia-





**Figure 1: Platelet count, immature platelets and TPO plasma levels.** A) Platelet count in the three study groups: healthy subjects (control), ITP patients at inclusion (ITP-bR) and after responding to TPO-RA (ITP-aR). B) Immature platelets determined by flow cytometry as referred in Methods and shown as %. C) Plasma TPO levels. Wilcoxon matched-pairs signed rank test

was performed to compare data of ITP patients before and after responding to TPO-RA treatment. One-way ANOVA and Dunn's multiple comparison test were performed for comparisons with control group and  $p < 0.05$  was considered significant. NS, not significant. Results expressed as mean  $\pm$  SD.

zole orange; BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Samples were analysed on a FACScan flow cytometer (BD Biosciences).

#### Plasma TPO

EDTA-anticoagulated whole blood was centrifuged at 1,500 g for 15 min at 23°C to obtain platelet poor plasma (PPP) which was then centrifuged at 10,000 g for 15 min at room temperature (RT). Supernatant plasma was stored at -70°C until analysis. Plasma TPO was determined using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, DuoSet-R&D, Minneapolis, MN, USA).

#### Determination of plasma microparticle (MP) procoagulant activity

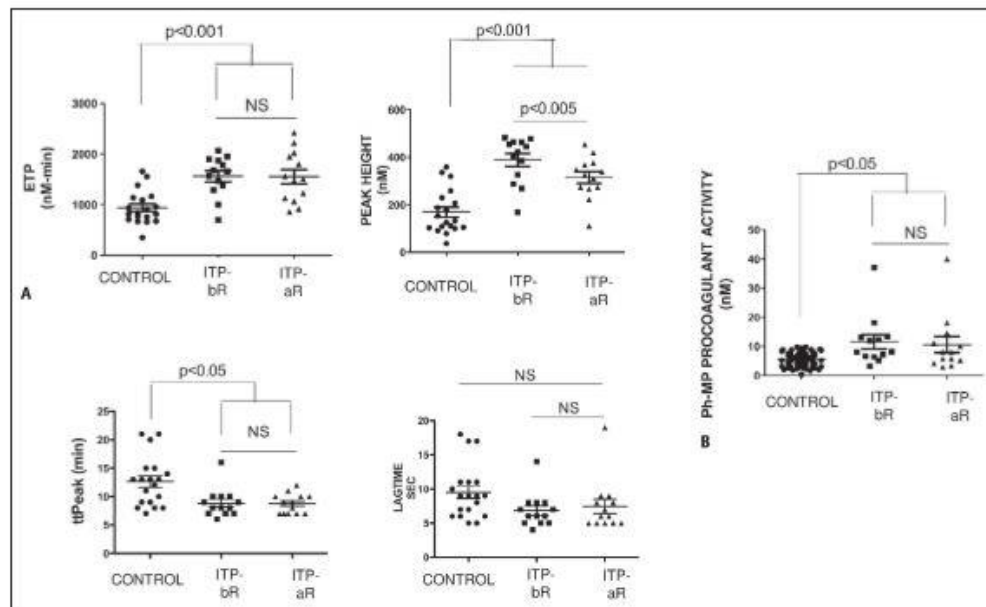
Citrated blood was centrifuged at 1,500 g for 15 min at 23°C. PPP was additionally centrifuged twice at RT (15 min at 1,500 g, and 2 min at 13,000 g). Platelet-free plasma (PFP) aliquots were stored at -70°C until analysis. Phosphatidylserine-MP (Ph-MP) and tissue factor-MP (TF-MP) dependent procoagulant activities were determined with the ZYMUPHEN kits (Hyphen BioMed, Neuville sur Oise, France) following the manufacturer's instructions.

#### Determination of plasma procoagulant activity

Plasma thrombin generation was measured in 80  $\mu$ L aliquots of PFP using the Calibrated Automated Thrombogram (CAT) test as described by Hemker et al. (13) at a final concentration of 1 pM tissue factor and 4  $\mu$ M phospholipids (PPP-Reagent LOW, Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands). Thrombin progress curves were recorded continuously with a Fluoroskan FL instrument (Thermo Labsystems, Helsinki, Finland) under the control of Thrombinoscope software version 3.6 (Thrombinoscope BV), filtered for excitation at 390 nm and emission at 460 nm. All assays were run in triplicate. We evaluated the endogenous thrombin potential (ETP, the total amount of thrombin generated over time); the lag time (the time to the beginning of the explosive burst of thrombin generation); the peak height of the curve (the maximum thrombin concentration produced); and the time to the peak (TTP).

#### Determination of platelet activation

PRP was diluted 1:5 with HEPES buffer and incubated with 100  $\mu$ M thrombin receptor-activating peptide 6 (TRAP, Bachem, Switzerland) at RT for 10 min. Next, fluorescein-isothiocyanate (FITC)-PAC1 (BD Biosciences, Madrid, Spain), a mAb that recognises activated conformation of fibrinogen receptor, was added for



**Figure 2: Plasma- and microparticle-associated procoagulant capacity.** A) Plasma procoagulant activity was measured by calibrated automated thrombography (CAT) and all measured parameters are shown. Detailed procedures are explained in *Methods*. B) Microparticle (MP)-associated procoagulant activity was determined with ZYMUPHEN MP-Activity kit. ITP-bR and ITP-aR are ITP patients at inclusion and after responding to TPO-RA,

respectively. Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed to compare data of ITP patients before and after responding to TPO-RA treatment. One-way ANOVA and Dunn's multiple comparison test were performed for comparisons with control group and  $p < 0.05$  was considered significant. NS, not significant.

15 min at RT in the dark. PAC1 binding was determined by flow cytometry analysis with a FACScan flow cytometer.

To determine fibrinogen receptor surface expression, diluted PRP was labelled with either PE-mAb against the  $\alpha$ IIb subunit or with FITC-mAb against the  $\beta$ 3 subunit of the platelet fibrinogen receptor (BD Pharmingen, Madrid, Spain).

#### Measurement of phosphatidylserine (PS) on platelet surfaces

Washed platelets were resuspended in Annexin V binding buffer (10 mM Hepes, 10 mM NaOH, 140 mM NaCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4) and labelled with FITC-Annexin V (BD Pharmingen, Madrid, Spain). Samples were analysed by flow cytometry.

#### Statistical analysis

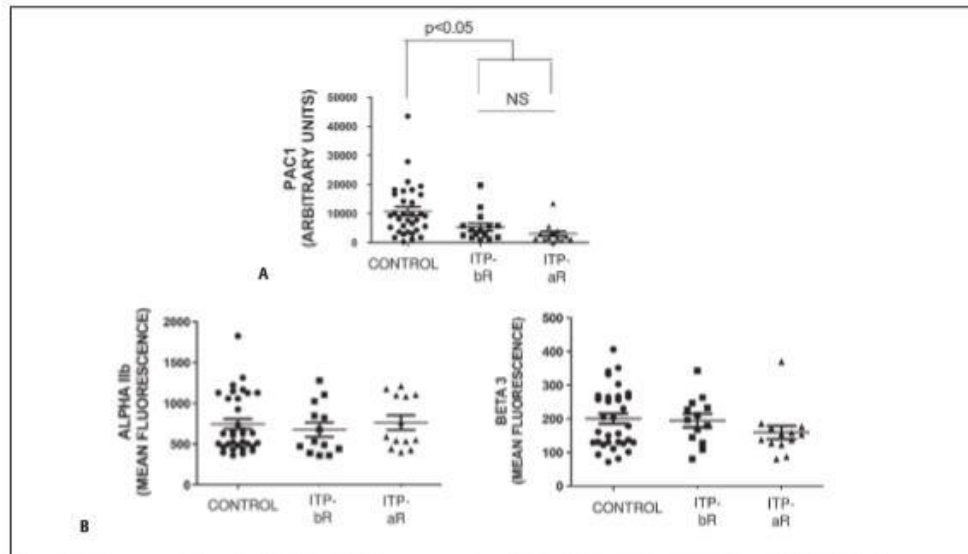
Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed to compare data of ITP patients before and after responding to TPO-RA treatment. One-way ANOVA and Dunn's multiple comparison test were performed for comparisons with control group. Correlations

between variables were determined by the Spearman's correlation test. Statistical analyses were performed using SPSS software version 17.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA).  $P < 0.05$  was considered significant.

## Results

### Patient demographics and clinical data

Thirteen chronic ITP patients (57% female), mean age 59.7 years (range 38–81) and 25 healthy individuals (55% female), mean age 47 (range 20–80) were included in the study. Two patients had background of thrombotic events (one acute ischaemic stroke and the other coronary artery disease with aorto-coronary by-pass grafting). ► Table 1 shows clinical ITP patient characteristics, TPO-RA initial and at sampling (ITP-aR) doses and platelet counts. Two patients who had previously received romiplostin switched to eltrombopag because of severe depression as an adverse effect (patient 6) and difficulties with dose adjustment (patient 8). Another (patient 12) began being treated with eltrombo-



**Figure 3: Surface expression and activation of fibrinogen receptor evaluated by flow cytometry.** ITP-bR and ITP-aR are ITP patients at inclusion and after responding to TPO-RA, respectively. A) Platelets were stimulated with 100  $\mu$ M TRAP, and then binding of FITC-PAC1 mAb was assayed. Data were expressed as arbitrary units (mean fluorescence  $\times$  % of positive cells). B) Fibrinogen receptor subunits  $\alpha$ IIb and  $\beta$ 3 in platelets were deter-

mined with the respective specific PE- and FITC-mAbs. Results were expressed as mean fluorescence before and after responding to TPO-RA treatment. One-way ANOVA and Dunn's multiple comparison test were performed for comparisons with control group and  $p < 0.05$  was considered significant. NS, not significant.

pag and switched to romiplostin because of lack of response to eltrombopag.

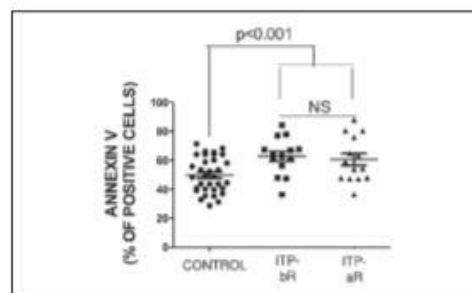
#### Platelet counts, immature platelets and TPO plasma levels

Platelet counts in the ITP-bR group were lower than in the other groups ( $\blacktriangleright$  Figure 1A), whereas the proportion of immature platelets in ITP-bR subjects was higher ( $\blacktriangleright$  Figure 1B).

TPO plasma level was higher in ITP-bR patients than in healthy controls but not significantly different when compared with the values of the ITP-aR group ( $\blacktriangleright$  Figure 1C).

#### Plasma and plasma MP-associated procoagulant capacity

Plasma and Ph-MP-associated procoagulant capacity were higher in ITP-bR than in controls, whereas TF-MP-associated procoagulant activity was practically negligible in both groups. TPO-RA treatment did not change these procoagulant profiles ( $\blacktriangleright$  Figure 2A and B).



**Figure 4: Platelets surface PS expression.** PS surface expression in quiescent platelets from healthy subjects (control), ITP patients at inclusion (ITP-bR) and after responding to TPO-RA (ITP-aR) was determined by binding of FITC-Annexin V and flow cytometry analysis. Data were expressed as % of positive platelets. Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed to compare data of ITP patients before and after responding to TPO-RA treatment. One-way ANOVA and Dunn's multiple comparison test were performed for comparisons with control group and  $p < 0.05$  was considered significant. NS, not significant.



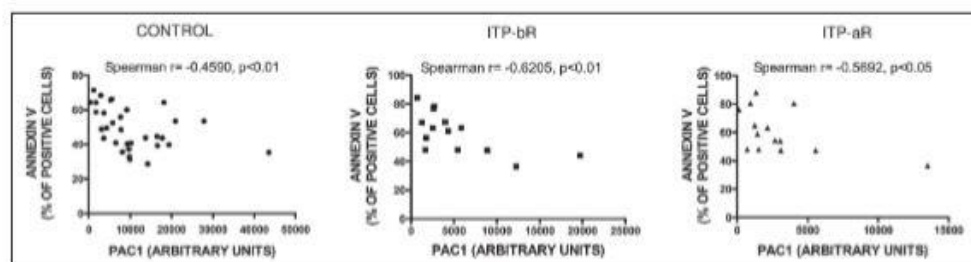


Figure 5: Relationship between apoptosis and platelet activation ability. Correlation is shown between FITC-Annexin V binding to platelets in basal conditions and FITC-PAC1 binding after stimulation with TRAP in controls and ITP-bR and ITP-aR patients. Data was analysed with the Spearman test and  $p < 0.05$  was considered significant.

### Surface expression and activation of fibrinogen receptor

In order to exclude higher platelet activation as the reason for elevated MP production and consequently increased MP-associated procoagulant activity in ITP patients, platelet surface expression of  $\alpha$ IIb and  $\beta$ 3, fibrinogen receptor subunits, and their response to activation, was explored in all groups.

Fibrinogen receptors on platelets from ITP patients showed reduced activation after TRAP stimulation compared to healthy controls (► Figure 3A), which was not due to a reduction in their surface expression (► Figure 3B). PAC1 binding of platelets from ITP-bR and ITP-aR patients in basal conditions did not differ from controls (data not shown).

### Platelet surface PS expression

We studied platelet apoptosis through surface PS expression to elucidate whether apoptosis could explain the observed MP-associated procoagulant profile in ITP patients before and after responding to TPO-RA treatment.

As observed in ► Figure 4, platelets from ITP-bR and ITP-aR patients expressed more surface PS than platelets from healthy controls. Moreover, in all the groups, surface PS expression seemed to condition fibrinogen receptor activation capacity (► Figure 5).

### Discussion

The recently introduced TPO-RAs for the treatment of ITP, romiplostim and eltrombopag, stimulate platelet production, in contrast to previous therapies that work to reduce immune-mediated platelet destruction. The observation of a low frequency of bleeding episodes, suggesting enhanced platelet function in ITP patients (5), and the increased risk of thromboembolism (8), has raised the question of whether the response to TPO-RA treatment can enhance this risk. In order to clarify this matter, we studied the procoagulant state of ITP patients who responded to TPO-RA.

We observed that when platelet count was recovered, TPO plasma levels and the percentage of circulating immature platelets were reduced.

It has been reported that TPO-R stimulation *in vitro* enhances platelet reactivity to agonists, possibly by increasing young, large and more reactive platelets (14–16). Similarly to Psaila et al. (17) we found no significant differences between ITP patients and controls in platelet basal surface expression of activated fibrinogen receptors and a decreased response to activation with TRAP before treatment with eltrombopag, but these authors showed that this impairment in platelet activation induced by TRAP disappeared after treatment with eltrombopag. On the other hand, Panzer et al. (4) proposed that platelets from ITP patients were more activated *in vivo*, but that their response to stimulation by TRAP was reduced.

Regarding procoagulant conditions of plasma from ITP patients, we observed an increased but similar level of thrombin generation before and after responding to TPO-RA treatment. Taking into account the experimental conditions of the performed CAT experiments, the increased plasma procoagulant characteristic of ITP patients seems to rely on a plasma factor and not on MPs or the thrombocytopenia observed in these patients. To further support the hypothesis that the thrombocytopenic condition does not increase plasma thrombin generation, we recently reported that thrombin generation in plasma from myelodysplastic syndrome patients with thrombocytopenia was similar to the healthy control group (18).

A recently published retrospective study evaluated the effect of TPO-RA treatment on the coagulation of ITP patients by using D-dimer as a marker of coagulation activation (19). This study reveals that there was a decrease in the amount of D-dimers after responding to TPO-RA treatment. Nevertheless, the authors of this study recognised the limitation of having assessed only D-dimer levels in these patients.

Another group reported that FVIII, FIX and FXI seemed to be increased in ITP patients (9). This fact does not seem to solely explain the observed increases in ETP and peak values in thrombin generation, because when CAT experiments were performed with

### What is known about this topic?

- Despite low platelet counts, immune-mediated thrombocytopenia (ITP) patients may have an increased risk for thrombosis
- Thrombopoietin receptor antagonists (TPO-RA) may be useful for the treatment of ITP patients because they may increase platelet counts.
- The effect of TPO-RA treatment on the thrombogenic capacity of ITP patients has not been evaluated.

### What does this paper add?

- Platelets from ITP patients presented a lower capacity to be stimulated by agonists and expressed more PS on their surfaces, and these events were not modified by TPO-RA treatment.
- ITP patients presented an enhanced procoagulant state when compared to healthy controls, and it was not increased after recovering their platelet count as consequence of the TPO-RA treatment.

1 pM TF they did not depend on FVIII, FIX and FXI levels (20), indicating that additional alterations might be involved.

Ph-MP-associated procoagulant activity, but not TF-MP-associated procoagulant activity, was also increased in ITP patients at inclusion and after responding to TPO-RA treatment. MP subpopulations are well known for their procoagulant activity, which relies mainly on the expression of PS and tissue factor (21). Sewify et al. (9) reported that ITP patients had higher levels of red cell- and platelet-derived MP regardless of the platelet count and this fact might explain the negligible TF-MP-procoagulant activity observed in these patients because both cellular types do not express TF (22-24).

Augmented platelet activation does not seem to be the cause of the increased MP-related procoagulant activity because we did not find an enhanced platelet activation capacity. On the other hand, the potential role of platelet apoptosis as the origin of the increase in MP could not be excluded because ITP patients, irrespective of platelet count and compared to normal controls, exposed higher PS levels. Moreover, an inverse correlation was found between surface PS and the ability of fibrinogen receptor to be activated, suggesting that apoptosis might dampen fibrinogen receptor activation mechanisms, as previously reported (25).

ITP patients have a higher risk of suffering venous thromboembolism (26, 27). It has been reported that treatment with TPO-RA does not increase this risk (28, 29) and our CAT results seem to be in line with this observation since ITP patients procoagulant profile is not increased after responding to the treatment. On the other hand, and even when speculative, the low ability of platelets to be stimulated might protect against an augmented thrombosis risk despite the increase in platelet count after responding to TPO-RA.

In summary, ITP patients presented a procoagulant state that was not increased after recovering their platelet count as consequence of the TPO-RA treatment. Platelets from ITP patients presented a lower capacity to be stimulated by agonists and ex-

pressed more PS on their surfaces, and these events were not modified by TPO-RA treatment.

### Acknowledgements

The authors are grateful for the skillful collaboration of the nursing staff and assistants from the Blood Donor Section of the Hematology Unit of La Paz University Hospital. NVB holds a Miguel Servet tenure-track grant from FIS and EGA-S a Ramón y Cajal grant from the Spanish MEC. Manuel García-Losa, M.D., a medical writer from IMS Health\*, supported by funding from GlaxoSmithKline, provided editorial assistance to the authors during preparation of this manuscript.

### Conflicts of interest

None declared.

### References

1. Cuker A, Cines DB. Immune thrombocytopenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010; 2010: 377-384.
2. Stasi R, Newland AC. ITP: a historical perspective. *Br J Haematol* 2011; 153: 437-450.
3. Neunert C, Lim W, Crowther M, et al. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood* 2011; 117: 4190-4207.
4. Panzer S, Hocker L, Rieger M, et al. Agonist-inducible platelet activation in chronic idiopathic autoimmune thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2007; 79: 198-204.
5. Provan D, Stasi R, Newland AC, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood* 2010; 115: 168-186.
6. Cuker A. Toxicities of the thrombopoietic growth factors. *Semin Hematol* 2010; 47: 289-298.
7. Kim KJ, Baek JW, Yoon CH, et al. Thrombotic risk in patients with immune thrombocytopenia and its association with antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol* 2013; 161: 706-714.
8. Norgaard M. Thrombosis in patients with primary chronic immune thrombocytopenia. *Thromb Res* 2012; 130 (Suppl 1): S74-75.
9. Sewify IM, Sayed D, Abdel Aal RE, et al. Increased circulating red cell microparticles (RMP) and platelet microparticles (PMP) in immune thrombocytopenic purpura. *Thromb Res* 2013; 131: e59-63.
10. Schipperus M, Fijnheer R. New therapeutic options for immune thrombocytopenia. *Neth J Med* 2011; 69: 480-485.
11. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, et al. Standardisation of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood* 2009; 113: 2386-2393.
12. Hayashi S, Oshida M, Kiyoi T, et al. Reticulated platelet determination: methodologies and applications for the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Rinsho Ketsueki* 1999; 40: 205-212.
13. Hemker HC, Giesen PL, Ramirez M, et al. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost* 2000; 83: 589-591.
14. Harker LA. Platelets in thrombotic disorders: quantitative and qualitative platelet disorders predisposing to arterial thrombosis. *Semin Hematol* 1998; 35: 241-252.
15. Harker LA, Marzec UM, Hunt P, et al. Dose-response effects of pegylated human megakaryocyte growth and development factor on platelet production and function in nonhuman primates. *Blood* 1996; 88: 511-521.
16. Peng J, Friese P, Wolf RE, et al. Relative reactivity of platelets from thrombopoietin- and interleukin-6-treated dogs. *Blood* 1996; 87: 4158-4163.
17. Psaila B, Bussel JB, Linden MD, et al. In vivo effects of thrombopoietin on platelet function in immune thrombocytopenia: no evidence of platelet activation. *Blood* 2012; 119: 4066-4072.

18. Martín M, de Paz R, Jiménez-Yuste V, et al. Platelet apoptosis and agonist-mediated activation in myelodysplastic syndromes. *Thromb Haemost* 2013; 109: 909-919.
19. Ghanima W, Lee SY, Barsam S, et al. Venous thromboembolism and coagulation activity in patients with immune thrombocytopenia treated with thrombopoietin receptor agonists. *Br J Haematol* 2012; 158: 811-814.
20. Diehl AW, Castoldi F, Spronk HM, et al. Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 125-131.
21. Lacroix R, Dignat-George F. Microparticles as a circulating source of procoagulant and fibrinolytic activities in the circulation. *Thromb Res* 2012; 129 (Suppl 2): S27-29.
22. Bouchard BA, Gissel MT, Whelihan MF, et al. Platelets do not express the oxidized or reduced forms of tissue factor. *Biochim Biophys Acta* 2013; Epub ahead of print.
23. Bouchard BA, Mann KG, Butenas S. No evidence for tissue factor on platelets. *Blood* 2010; 116: 854-855.
24. Jy W, Johansen ME, Bidot C, Jr., et al. Red cell-derived microparticles (RMP) as haemostatic agent. *Thromb Haemost* 2013; 110: 751-760.
25. Schoenwacker SM, Jarman KE, Gardiner EE, et al. Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetics can induce a transient thrombocytopenia that undermines the hemostatic function of platelets. *Blood* 2011; 118: 1663-1674.
26. Kuter DJ, Rummel M, Boccia R, et al. Romiplostim or standard of care in patients with immune thrombocytopenia. *N Engl J Med* 2010; 363: 1889-1899.
27. Sarpatwari A, Bennett D, Logie JW, et al. Thromboembolic events among adult patients with primary immune thrombocytopenia in the United Kingdom General Practice Research Database. *Haematologica* 2010; 95: 1167-1175.
28. Bussel JB, Kuter DJ, Pullarkat V, et al. Safety and efficacy of long-term treatment with romiplostim in thrombocytopenic patients with chronic ITP. *Blood* 2009; 113: 2161-2171.
29. Cheng G, Saleh MN, Marcher C, et al. Eltrombopag for management of chronic immune thrombocytopenia (RAISE): a 6-month, randomised, phase 3 study. *Lancet* 2011; 377: 393-402.



grasiva. Estudio de coagulación: AP 67 %, TTPa 36.5 sec, FvWAg 392 %, FvW CoR. 222 %, Ratio vWCoR/vWAg 0.6, Factor XIII Ag 30 %. Tras 5 días con desmopresina y ácido tranexámico, buena respuesta y estabilización de la hemoglobina. Tras retirar ECMO se normaliza la coagulación. Falleció por imposibilidad de ventilación y fallo multicorgánico.

- **Caso clínico 4:** varón 46 años con HTP y fracaso del ventrículo derecho; precisó ECMOva como puente al trasplante. Coagulación basal normal. Al séptimo día presentó sangrado pericárdico y hematoquecia. Coagulación: Factor vWAg 219 %, Factor vW CoF. R. 117 %, Ratio vWCoR/vWAg 0.5 y Factor XIII Ag 16.6 %. Preciso transfusiones de CH, PFC, plaquetas y fibrinógeno. Trasplantado sin complicaciones hemorrágicas. No administrados concentrados de factores. Al retirar el ECMO se normalizaron parámetros.

**Conclusión:** La implicación del SvWA y déficit de FXIII adquiridos en hemorragias graves ha generado gran interés en el diagnóstico precoz y manejo de pacientes sometidos a ECMO. Las opciones incluyen ácido tranexámico, desmopresina, concentrados de factores (FVIII/FvW), fibrinógeno, FVIIa y concentrado de FXIII. No existe consenso sobre el manejo óptimo perioperatorio ni del sangrado; precisándose más estudios al respecto.

### PC-317 Características de las plaquetas de los pacientes de trombocitopenia inmune (PTI) que responden a distintos tratamientos

Rivas Pollmar M.I., Álvarez Román M.T., Fernández Bello I., Martín Salces M., Jiménez Yuste V., Butta Coll N.  
Hospital Universitario La Paz, Madrid

**Antecedentes:** Los pacientes con PTI presentan una variada presentación de la enfermedad, en la cifra de plaquetas, en la respuesta a los tratamientos y en su curso clínico. La decisión de iniciar el tratamiento se basa en la sintomatología hemorrágica y en el recuento plaquetario. Las inmunoglobulinas intravenosas (IGIV) se suelen administrar en pacientes con hemorragia grave con recuentos plaquetarios < 20.000 plaquetas/ml o en los que se requiere una respuesta rápida. Los agonistas de los receptores de trombopoyetina (AR-TPO) se usan para tratar a los pacientes con PTI que no responden a esplenectomía o a aquellos en los que ésta está contraindicada. Todos estos abordajes terapéuticos aumentan el recuento de las plaquetas y mejoran la hemostasia a través de diferentes mecanismos.

**Objetivos:** Evaluar las características de las plaquetas y de la capacidad trombogénica del plasma y de las micropartículas de los pacientes de PTI que responden a los diferentes tipos de tratamiento.

**Métodos:** Se reclutaron pacientes con PTI antes y después de responder al tratamiento con IGIV (n=11) y con AR-TPO (4 pacientes con romiplostim y 10 con eltrombopag), 5 pacientes esplenectomizados y 82 controles sanos.

El porcentaje de plaquetas reticuladas, la activación plaquetaria y la unión de anexina-V se evaluaron por citometría de flujo, y elTPO y elAPRIL por ELISA. La actividad procoagulante asociada a micropartículas (MP) y al plasma para generar trombina se determinaron, respectivamente, con el kit de Zymuphen y por trombinografía.

**Resultados:** Los pacientes con PTI que respondieron a IGIV y a AR-TPO recuperaron el número de plaquetas sin alcanzar los niveles del grupo control mientras que el recuento de las plaquetas en los pacientes esplenectomizados no difirió del mismo. Los niveles plasmáticos de TPO y el número de plaquetas inmaduras en los dos primeros grupos antes de responder a los tratamientos fueron más altos que en los controles. A pesar de la recuperación en el número de plaquetas, la capacidad de activación de las mismas tras la activación del receptor de fibrinógeno con TRAP (agonista del receptor para trombina PAR-1) fue menor que la de los controles en todos los grupos. Esta disminución no se debió a una reducción en la expresión del receptor de fibrinógeno.

Las plaquetas de todos los pacientes con PTI, antes y después de responder a los tratamientos, mostraron exponían más fosfatidilserina y tenían mayor capacidad trombogénica asociada a micropartículas y al plasma.

Los niveles de APRIL, ligando estimulante de los linfocitos B y de la producción de anticuerpos, disminuyeron en los pacientes con PTI que respondieron a los AR-TPO alcanzando los niveles observados en el grupo control. En el grupo de pacientes esplenectomizados también se observó una disminución de los mismos, pero siguieron siendo más altos que en los controles sanos.

**Conclusiones:** Los pacientes con PTI que respondieron a los tratamientos con IGIV y AR-TPO y los que se sometieron a esplenectomía recuperaron el número de plaquetas pero no su función. Los tratamientos no modificaron la capacidad trombogénica asociada a micropartículas y al plasma.

### PC-318 Características clínicas y aproximación terapéutica en los hematomas espontáneos de los músculos rectos

Pons Escoll V. (1), Suriñach J.M. (2), López-Andreu L. (1), Loureiro J. (2), Olivera P. (1), Molero A. (3), Marín A. (3), Bosch F. (3), Santamaría A. (1)

(1) Unidad de Hemostasia y Trombosis, Servicio de Hematología, (2) Servicio de Medicina Interna y (3) Servicio de Hematología, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona

**Introducción:** El hematoma espontáneo de la vaina de los músculos rectos del abdomen (HR) es una entidad poco frecuente y que suele asociarse al uso de fármacos antitrombóticos. Sus características clínicas y tratamiento están poco establecidos.

**Objetivos:** Analizar la presentación clínica y el tratamiento de los pacientes con HR referidos a la Unidad de Hemostasia de un hospital de tercer nivel.

**Métodos:** Estudio retrospectivo de todos los pacientes con HR referidos a nuestra Unidad desde enero de 2008 hasta mayo de 2014.